

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年2月21日 (21.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/14504 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 7/08, 14/47,
16/18, C12P 21/08, A61K 38/17, 39/395, 48/00, A61P
3/02, 3/14, 13/12, 19/00, 19/08, 19/10, 35/00奈川県横浜市金沢区福浦一丁目13番5号 麒麟麦酒
株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa (JP). 福本誠二
(FUKUMOTO, Seiji) [JP/JP]; 〒113-8655 東京都文京
区目白台3-28-6 東京大学 医学部付属病院 分院検査
部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06944

(22) 国際出願日: 2001年8月10日 (10.08.2001)

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル3階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-245144 2000年8月11日 (11.08.2000) JP
特願2000-287684 2000年9月21日 (21.09.2000) JP
特願2000-391077
2000年12月22日 (22.12.2000) JP
特願2001-121527 2001年4月19日 (19.04.2001) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号
Tokyo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山下武美 (YA-
MASHITA, Takeyoshi) [JP/JP]. 島田孝志 (SHIMADA,
Takashi) [JP/JP]; 〒370-1295 群馬県高崎市宮原町3番
地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP).
水谷 悟 (MIZUTANI, Satoru) [JP/JP]; 〒236-0004 神

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: POLYPEPTIDES CONTROLLING PHOSPHORIC ACID METABOLISM, CALCIUM METABOLISM, CALCIFICA-
TION AND VITAMIN D METABOLISM AND DNAs ENCODING THE SAME(54) 発明の名称: リン酸代謝、カルシウム代謝、石灰化及びビタミンD代謝を調節するポリペプチド並びにそれを
コードするDNA(57) Abstract: DNAs encoding the following polypeptides (a), (b), (c) and (d); (a) a polypeptide comprising an amino acid sequence
represented by SEQ ID NO:2 or 4; (b) a polypeptide comprising an amino acid sequence derived from an amino acid sequence
represented by SEQ ID NO:2 or 4 by the deletion, substitution or addition of one to several amino acids and having an activity
of inducing hypophosphatemia, an activity of inhibiting phosphoric acid transportation, an activity of inhibiting calcification or an
activity of controlling vitamin D metabolism *in vivo*; (c) a polypeptide comprising a partial sequence of the amino acid sequence
represented by SEQ ID NO:2 wherein the partial sequence contains at least the amino acid sequence ranging from the 34th to 201st
amino acids in the above-described amino acid sequence; and (d) a polypeptide comprising a partial sequence of the amino acid
sequence represented by SEQ ID NO:2 wherein the partial sequence: (i) contains at least the amino acid sequence ranging from the
34th to 201st amino acids in the above-described amino acid sequence; (ii) comprises an amino acid sequence having the deletion,
substitution or addition of one to several amino acids; and (iii) has an activity of inducing hypophosphatemia, an activity of inhibiting
phosphoric acid transportation, an activity of inhibiting calcification or an activity of controlling vitamin D metabolism *in vivo*.

[続葉有]



(57) 要約:

以下の(a)、(b)、(c) 又は(d)のポリペプチドをコードする DNA。

(a) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(d) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、(i) 前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含み、(ii) 当該部分配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、(iii) 低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有する、前記ポリペプチド

明 細 書

リン酸代謝、カルシウム代謝、石灰化及びビタミン D 代謝を調節する
ポリペプチド並びにそれをコードする DNA

技術分野

本発明は、リン酸代謝、カルシウム代謝、石灰化および/またはビタミン D 代謝を調節するポリペプチド、同ポリペプチドをコードする DNA、同ポリペプチドを有効成分とする医薬組成物、および同ポリペプチドを認識する抗体と同抗体を有効成分とする医薬組成物、同抗体を用いた診断方法と診断用組成物に関する。

背景技術

無機リン酸（以下、「リン酸」ということがある。）は、生体のエネルギー代謝、細胞の機能維持に必須であるとともに、カルシウムと協同して石灰化組織の形成に重要な役割を持つ。生体へのリン酸の供給は、主に腸管での吸収に依存し、排泄は腎における尿中排泄と腸管における糞中排泄による。リン酸は、生体内では体液、細胞内液、石灰化組織に流動的に分布している。成人における無機リン酸の吸収量と排泄量はほぼ同等に保たれていることから、リン酸代謝の恒常性を保つ制御機構の存在が示唆されている。リン酸と同様の生体内分布を示し、血中濃度の恒常性を有するカルシウムの代謝調節は、哺乳動物において少なくとも副甲状腺ホルモン、カルシトニン、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ などの調節因子により協調的に行われていることが知られている。

リン酸の代謝調節においては、副甲状腺ホルモンがリン酸排泄を促進すること、あるいは $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ が腸管におけるリン酸の吸収を促進することが知られており、カルシウム代謝と密接に関連していることが明らかである。しかしながら、リン酸を主体的に調節する物質はいまだ明らかにされていない。

ところで、リン酸代謝の恒常性が失われ、血中の無機リン酸濃度が低下する疾患としては、原発性副甲状腺機能亢進症、遺伝性の低リン酸血症性くる病、腫瘍

性骨軟化症などがあげられる。

原発性副甲状腺機能亢進症は、副甲状腺での副甲状腺ホルモンの過剰産生を特徴とする疾患であり、過剰に産生された副甲状腺ホルモンが腎臓での無機リン酸の再吸収を抑制することにより、リン酸過剰排泄型の低リン酸血症を呈することが知られている。

また、遺伝子疾患に起因する低リン酸血症には、I型ビタミンD依存性くる病、II型ビタミンD依存性くる病、ビタミンD抵抗性くる病などが知られている。I型ビタミンD依存性くる病は、活性化ビタミンD合成酵素の遺伝的機能不全が原因で生ずる疾患であり、II型ビタミンD依存性くる病はビタミンD受容体の遺伝的機能不全によるものであり、両者ともにビタミンD₃の作用が減弱することにより低カルシウム血症とともに低リン酸血症を呈するものである。一方、ビタミンD抵抗性くる病は、伴性染色体性のものと常染色体性の低リン酸血症性くる病の少なくとも二種の原因の異なる病態が存在することが知られている。

上記ビタミンD抵抗性くる病の両病態では、腎臓からの無機リン酸の漏出を特徴とした低リン酸血症を呈する。近年、伴性染色体性の低リン酸血症（X-linked hypophosphatemia：以下「XLH」と呼ぶことがある。）患者では、X染色体上のPHEXと命名されたエンドペプチダーゼ様蛋白質をコードする遺伝子の変異により誘導されることが明らかにされた。しかし、PHEX蛋白質の機能異常が低リン酸血症を誘導する機序については明らかではない。興味深いことに、低リン酸血症を呈する自然変異マウス（Hyp）の遺伝子解析から、このマウスではPHEXをコードする遺伝子が部分欠損していることが明らかとなった。このマウスを用いた実験により、PHEX欠損マウスの腎機能は正常であることやHypマウスの体液中に低リン酸血症を誘導する副甲状腺ホルモンとは異なる液性因子が存在することが示されている。常染色体性の低リン酸血症（Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia：以下ADHRということがある。）に関しては、疾患の責任遺伝子の追求がなされており、連鎖解析により12p13の領域に存在することが報告されている。しかし、依然として絞り込まれた領域は広く、多くの遺伝子がそこには含まれており候補遺伝子を特定するには至っていない。

腫瘍性骨軟化症は、腫瘍形成に伴って腎臓からの無機リン酸排泄が増加して低

リン酸血症を呈し、腫瘍への放射線照射や腫瘍の除去を行うことで低リン酸血症が消失することを特徴とする疾患である。この疾患においても腎臓でのリン酸の再吸収を抑制することによる低リン酸血症を誘導する因子を腫瘍が産生すると考えられている。

ビタミン D 抵抗性くる病において想定される原因分子と、腫瘍性骨軟化症において想定される原因分子が同一であるかどうかは確定していないが、両者は明らかにリン酸の尿中排泄を促進する未知のリン酸代謝因子であるという点で一致している。この想定されるリン酸代謝調節因子は、しばしば Phosphatonin という名称で呼ばれることがある。この未知のリン酸代謝調節因子と、ビタミン D 抵抗性くる病や腫瘍性骨軟化症との関連性については総説としてもまとめられている (Neison, A. E., *Clinical Endocrinology*, 47:635-642, 1997; Drezner, M. K., *Kidney Int.*, 57:9-18, 2000)。

ビタミン D 抵抗性くる病や腫瘍性骨軟化症におけるもう一つの特徴は、骨の石灰化障害である。この骨の石灰化障害は、低リン酸血症により二次的に生じているとも考えられるが、ビタミン D 抵抗性くる病のモデルマウスである Hyp マウスの実験では、骨石灰化異常がリン酸濃度に依存せずに生じることが示されており (Ecarot, B., *J. Bone Miner. Res.*, 7:215-220, 1992; Xiao, Z. S., *Am. J. Physiol.*, E700-E708, 1998)、上述の未知のリン酸代謝調節因子が直接的に骨組織の石灰化を調節している可能性も考えられる。

上述のように、リン酸代謝を調節する未知の因子が存在する可能性が強く示唆される研究データが報告されているが、想定される活性を呈示する実体を分子的に明らかにした例はない。WO99/60017 には、新規ポリペプチドホルモン Phosphatonin として新規のポリペプチド配列が開示されているが、Phosphatonin の特徴である低リン酸血症誘導活性は示されていない。これまで明らかにされていない生体由来のリン酸代謝調節因子が存在すると考えられた。

食物より摂取されるビタミン D₂ およびビタミン D₃、あるいは皮膚で合成されたビタミン D₃ は、主として肝臓に存在するビタミン D-25 位水酸化酵素により水酸化を受け、25-ヒドロキシビタミン D となる。その後、腎臓の近位尿細管上皮細胞に存在する 25-ヒドロキシビタミン D-1 α 位水酸化酵素により水酸化を受

け、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D となる。この $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、血清カルシウム、リン濃度を上昇させる生理活性を有するミネラル調節ホルモンであり、副甲状腺ホルモンの分泌抑制、骨吸収促進を担うことなども知られている。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、生体内においてさらに、主に腎臓や小腸に存在する 24 位水酸化酵素により水酸化を受け、上述の生理活性を有さない代謝物に変換される。この点において、24 位水酸化酵素は $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D の不活性化を担う酵素であると考えられている。一方、24 位水酸化酵素は、 25 -ヒドロキシビタミン D に対しても作用し、 $24,25$ -ジヒドロキシビタミン D に変換することが知られている。この $24,25$ -ジヒドロキシビタミン D には、骨量増加、軟骨分化促進などの生理作用が報告されており、生理活性を有するビタミン D 代謝物の生成酵素としての一面を有することが示唆されている。

ビタミン D の活性化に重要な役割を有する 1α 位水酸化酵素の発現レベルを調節する因子としては、副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D などが知られている。血中カルシウム濃度の低下により分泌が促進される PTH は、腎臓近位尿細管上皮細胞に存在する PTH 受容体に作用し、細胞内 cAMP の上昇を介して 1α 位水酸化酵素遺伝子の転写を促進し、血中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を上昇させる。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は腸管からのカルシウム吸収と腎臓でのカルシウム再吸収を促進し、結果として血中カルシウム濃度を上昇させる。他方、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、ビタミン D 受容体(VDR)と結合して 1α 位水酸化酵素遺伝子や PTH 遺伝子のプロモーター領域に作用して、これらの遺伝子の転写抑制をおこなっていることが報告されている。つまり、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、その活性化因子である PTH および 1α 位水酸化酵素に対してフィードバック制御を有しており、この機構がカルシウム代謝の恒常性維持において重要な役割を担っている。

近年、血清リン酸濃度の低下が 1α 位水酸化酵素遺伝子の発現を亢進することが報告されている。リン酸代謝においても、血清リン酸濃度の低下に伴う 1α 位水酸化酵素遺伝子の発現上昇が血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を上昇させ、結果として小腸からのリン酸吸収を促進することで血清リン酸濃度を是正するという機構の存在が推察されている。

24 位水酸化酵素遺伝子の発現調節を担う因子としては、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D、PTH 等が挙げられる。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、ビタミン D 受容体(VDR)を介して 24 位水酸化酵素遺伝子のプロモーター領域に存在するビタミン D 受容体応答配列に結合することで転写を促進することが判明している。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、24 位水酸化酵素を活性化して、代謝経路の活性化による $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度の低下を誘導すると考えられている。24 位水酸化酵素遺伝子の発現は PTH により抑制されることが知られているが、詳細な分子メカニズム明らかではない。

発明の開示

本発明は、血中のリン酸濃度低下を誘導することができる腫瘍由来の新規因子を提供することを目的とする。

腫瘍性骨軟化症で同定される腫瘍は、生理活性を有する分泌因子を放出して、その結果として血中のリン酸濃度が低下すると考えられる。この腫瘍由来因子がリン酸代謝の恒常性を破綻させるということは、①本来生体で産生されないものが腫瘍特異的に産生されるか、②正常組織においても産生されるが腫瘍に過剰に産生されるか、あるいは、③生理的な制御を受けずに腫瘍で産生されることのいずれかを特徴とすると考えられる。

本発明者は、前述のごとく腫瘍由来の低リン酸血症誘導因子が腫瘍性骨軟化症由来の腫瘍において特徴的に産生しているとの推察に基づき、腫瘍において低リン酸血症誘導因子をコードする遺伝子の転写が上昇していること、あるいはその因子の mRNA の安定性が上昇していることを予想した。そこで、腫瘍性骨軟化症腫瘍患者より治療目的で摘出した腫瘍組織の一部より RNA を抽出したのち、ファージベクターおよびプラスミドベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製して、腫瘍に特徴的に発現している遺伝子断片のスクリーニングを実行した。スクリーニングは腫瘍に特異的に発現していると考えられる cDNA 断片を選別する方法と腫瘍由来 cDNA ライブラリーより腎臓近位尿細管上皮細胞株由来の cDNA プローブと交差しない cDNA 断片を選別する方法を行った。そして、選択されてきた cDNA 断片の中で配列の新規性と腫瘍での特徴的な発現が確認できたものを

さらに絞込み、低リン酸血症誘導因子をコードすることが期待される cDNA 断片を複数得た。これらの配列情報から、それぞれの断片が帰属する ORF を含む cDNA のクローニングを試み、新規ポリペプチドをコードする DNA を取得した。さらにこの新規ポリペプチドの生物活性を見出すべく鋭意研究を進め、この新規ポリペプチドがリン酸輸送を抑制する活性を有すること、そして動物において低リン酸血症を誘導するとともに骨組織の石灰化を抑制することを明らかにし、本願発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(a)、(b)、(c) 又は(d)のポリペプチドをコードする DNA。

- (a) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (b) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチド
- (c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド
- (d) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、
 - (i) 前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含み、
 - (ii) 当該部分配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、
 - (iii) 低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有する、前記ポリペプチド

(2) 以下の(e)又は(f)の DNA を含む DNA。

- (e) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち第 133 番目～第 885 番目の塩基配

列若しくは配列番号 3 に示される塩基配列のうち第 1 番目～第 681 番目の塩基配列からなる DNA

- (f) 配列番号 1 若しくは 3 に示される塩基配列の全部若しくは一部の配列からなる DNA から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチドをコードする DNA

ここで、ストリンジェントな条件とは、ナトリウム濃度が 750mM 以上、好ましくは 900mM 以上であり、温度が 40℃以上、好ましくは 42℃の条件を満たすものをいう。具体的には、6×SSC、5×Denhardt、0.5% SDS、50% Formamide、42℃の条件をいう。

- (3) 前記 DNA を含む組換えベクター。

- (4) 前記組換えベクターを含む形質転換体。

- (5) 以下の(a)、(b)、(c) 又は(d)のポリペプチド。

- (a) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

- (b) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチド

- (c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

- (d) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、

- (i) 前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含み、

- (ii) 当該部分配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、

- (iii) 低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若し

くは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有する、

前記ポリペプチド

前記ポリペプチドには、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ (N-ビニル-ピロリドン)、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシドとポリエチレンオキシドとのコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール及びポリビニルアルコールからなる群から選択される少なくとも 1 つによって修飾されたものも含まれる。

(6) 前記ポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

上記医薬組成物は、生体のカルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミン D 代謝を調節し得るために使用することができる。また、上記医薬組成物は、高リン血症、副甲状腺機能亢進症、腎性骨異栄養症、異所性石灰化、骨粗鬆症及び高ビタミン D 血症からなる群から選ばれる少なくとも一つに有効である。

(7) 前記ポリペプチド又はこれらの部分断片と反応する抗体。

上記抗体は、本発明のポリペプチド又はその部分断片を抗原として動物に免疫する工程を含む方法によって得ることができる。

(8) 前記抗体を有効成分として含む医薬組成物。

上記医薬組成物は、生体のカルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミン D 代謝を調節することができる。また、骨疾患に有効である。ここで、骨疾患としては、骨粗鬆症、ビタミン D 抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病及び腫瘍性骨軟化症からなる群から選択される少なくとも 1 つが挙げられる。

(9) 前記抗体を含む、カルシウム代謝異常、リン酸代謝異常、石灰化異常及びビタミン D 代謝異常のうち少なくとも 1 つの異常を呈する疾患（例えば腎不全、腎性リン酸漏出症、尿細管性アシドーシス及びファンconi 症候群からなる群から選択される少なくとも 1 つ）の診断剤。

(10) 前記抗体を含む、骨疾患の診断剤。骨疾患としては、骨粗鬆症、ビタミン D 抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病及び腫瘍性骨軟化症からなる群から選択される少なくとも 1 つが挙げられる。

(11) 配列番号 11 に示す塩基配列を有する DNA 又はその部分断片を含む、カ

ルシウム代謝異常、リン酸代謝異常、石灰化異常及びビタミン D 代謝異常のうち少なくとも 1 つの異常を呈する疾患の診断剤。

部分断片としては、配列番号 11 に示す塩基配列のうち第 498 番から第 12966 番までの配列を有するものが挙げられ、疾患としては、常染色体優性低リン酸血症性くる病が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2000-245144 号、2000-287684 号、2000-391077 号及び 2001-121527 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本明細書において用いる用語につき、以下の通り定義する。

血中 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度低下活性とは、血中の活性型 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度を低下させる方向に働く活性を指す。

低リン酸血症誘導活性とは、血中のリン酸濃度を低下させる方向に働く活性を指す。血中のリン酸濃度は、(i)腸管からの吸収と尿および糞への排泄、並びに(ii)体内における細胞や骨組織に代表される石灰化組織との出納で規定される。したがって、本明細書でいう低リン酸血症誘導活性は、健全な生体に対して作用させた場合において血中リン酸濃度を低下させる活性を意味しており、必ずしも病的な低リン酸血症を引き起こすことを意味するものではない。単位組織では、腸管におけるリン酸吸収抑制活性、腎臓や腸管におけるリン酸排泄促進活性、あるいは細胞内へのリン酸移行促進活性と同等である場合がある。

また、本発明において、リン酸輸送抑制活性とは、対象細胞に作用してその細胞膜に存在するリン酸輸送担体の活性を抑制することを意味する。主たる対象細胞としては、腎臓尿細管上皮細胞、腸管上皮細胞又は骨芽細胞が考えられる。

さらに、本発明において、石灰化抑制活性とは、骨組織及び軟組織においてカルシウムとリン酸を組成物として含む結晶物を生成又は蓄積する過程を抑制する活性を意味する。

さらに、生体内ビタミン D 代謝調節活性とは、生体内に存在するビタミン D およびそれより体内にて合成される代謝物の絶対量の変化、又は存在比率の変化

を調節する効力を指す。これらのビタミン D およびその代謝物の生体内における調節は、(i)主に腸管における吸収又は排泄と、(ii)腎臓での再吸収又は排泄と、(iii)生体内におけるビタミン D の合成と、(iv)それに続く水酸化反応とを中心とした代謝的変換により規定される。(iv)の代謝的変換により生じる主たる代謝物としては、ビタミン D-25-水酸化酵素によりビタミン D の 25 位が水酸化されることにより生じる 25-ヒドロキシビタミン D、25-水酸化ビタミン D-25-1 α -水酸化酵素によりヒドロキシビタミン D の 1 α 位が水酸化されて生じる 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D、あるいは、これらの代謝物がさらに 24-水酸化酵素により 24 位に水酸基が導入されて生じる 24,25-ジヒドロキシビタミン D 又は 1 α , 24,25-トリヒドロキシビタミン D が知られている。ビタミン D 代謝調節活性は、このようなビタミン D 代謝物生成に関わる酵素の活性調節、遺伝子発現、又は発現蛋白量の変化を調節する活性として表されることもある。

1. リン酸代謝、カルシウム代謝、石灰化及びビタミン D 代謝を調節するポリペプチドをコードする DNA

(1) DNA のクローニング

本発明の DNA の一つである配列番号 1 に示す DNA は、腫瘍性骨軟化症が疑われる患者から摘出した腫瘍の一部より作製した cDNA ライブラリーのスクリーニングによって得られたものである。

ところで、腫瘍性骨軟化症は、腫瘍の存在に伴い低リン酸血症と骨組織の石灰化不全による骨軟化症を呈する疾患であり、腫瘍を除去するとこれらの症状が消失することを特徴とする。腫瘍抽出物がラットにおいて尿中リン酸排泄を促進すること (Popvtzer, M. M. et al., Clinical Research 29: 418A, 1981) や、摘出腫瘍のマウスへの移植実験により低リン酸血症が誘導されること (Miyauchi, A. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 67:46-53, 1988) が報告されているため、腫瘍が全身性の未知の因子を産生し分泌するものと考えられている。

本発明者が使用した腫瘍に関係する症例については、Fukumoto, S. et al., Bone 25:375-377, 1999 に記載されている。この症例は、腫瘍を手術的に摘出したことで、低リン酸血症が顕著に回復した。また、この症例における腫瘍のサイ

ズは径が約 1 cm 程度と小さいものであった。このような小さな組織より低リン酸血症と全身性の骨軟化症を惹起する活性物質が産生、分泌されていたことが推察されることを考えると、本発明者が調製した腫瘍由来の cDNA ライブラリー中に、このような病態の惹起にかかわる活性物質をコードする遺伝子の少なくとも部分的な断片が他の組織に由来する cDNA ライブラリーと比較して高頻度に含まれていることを予想した。そこで、この腫瘍由来の活性物質をコードする遺伝子の断片配列を同定することを目標として、本腫瘍 cDNA ライブラリーに特異的に多く含まれている cDNA 断片をディファレンシャルスクリーニング法にて抽出した。

次に、得られた cDNA 断片の塩基配列を同定し、相互比較を行い、塩基配列の重複をもとに同一遺伝子に由来すると考えられる配列はコンティグを作製して分類した。このようにして得られた塩基配列について、米国 National Center for Biotechnology Information (以下、「NCBI」ということがある。) が提供するデータベースである Genbank に登録されている塩基配列と相同性の検索を実施した。このような方法で本腫瘍 cDNA ライブラリーに特異的に多く含まれる塩基配列として、配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 1522 番から 2770 番までの配列を得た。この配列は Genbank にアクセッション番号 AC008012 で登録されているヒト 12p13 BAC RPCI11-388F6 の配列の一部と一致した。この登録配列はヒト染色体配列の 12p13 領域の部分配列を示していると考えられるものであった。この登録配列内の推定される遺伝子の位置は塩基配列情報とともに明記されているが、配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 1522 番から 2770 番までの配列、および本発明の配列番号 1 に示す塩基配列は、推定遺伝子部位として明記されていない。

次に、この配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 1522 番から 2770 番までの塩基配列をもとにプローブおよび PCR 用のプライマーを設計して、本腫瘍 cDNA ライブラリーに含まれる連続した塩基配列を単離同定して本発明の配列番号 1 に示す塩基配列を得た。配列番号 1 の塩基配列は、本発明の配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる分泌シグナルを有すると推定されるポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (以下「ORF」ということがある。) を有

していた。このポリペプチドのアミノ酸配列は Genbank のアミノ酸配列データベースに登録されていないことから、新規の配列を有するポリペプチドであると考えた。さらに本発明者は、配列番号 1 に示す塩基配列と配列番号 2 に示すアミノ酸配列を用いて検索を行い、この分子のマウスオーソログと考えられる配列番号 9 に示す塩基配列と配列番号 10 に示すアミノ酸配列を同定した。後述するように、ヒトのアミノ酸配列に従い作製した組み換え体蛋白質がマウスにおいて活性を示すことから、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と、配列番号 10 に示すアミノ酸配列又はマウス全長配列 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 277(2), 494-498) との比較により、両方で保存されているアミノ酸以外のアミノ酸を置換した蛋白質が本発明のポリペプチドと同等あるいは同種の生物活性を有することが、本発明により容易に推察できるようになった。

(2) 塩基配列の決定

上記(1)の通り得られた DNA について塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又は M13 ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機 (例えば PERKIN-ELMER 社製 373A DNA シークエンサー等) を用いて配列決定が行われる。

配列番号 1 に本発明の DNA の塩基配列を、配列番号 2 に本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるポリペプチドが低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性又はビタミン D 代謝調節活性を有する限り、当該アミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

例えば、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列から 1 又は数個、好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に 1 又は数個、好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の 1 又は数個、好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

また、置換の方法としては、アミノ酸の特性をある程度保持したファミリー内での保存的置換を行っても良い。アミノ酸側鎖の特性から一般的に分類されるファミリーは以下のものが挙げられる。

- (i) 酸性アミノ酸ファミリー： アスパラギン酸、グルタミン酸
- (ii) 塩基性アミノ酸ファミリー： リジン、アルギニン、ヒスチジン
- (iii) 非極性アミノ酸ファミリー：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン
- (iv) 非帯電極性アミノ酸ファミリー：グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン
- (v) 脂肪族ヒドロキシアミノ酸ファミリー：セリン、スレオニン
- (vi) アミド含有アミノ酸ファミリー：アスパラギン、グルタミン
- (vii) 脂肪族アミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
- (viii) 芳香族アミノ酸ファミリー：フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン
- (ix) 疎水性アミノ酸ファミリー：ロイシン、イソロイシン、バリン
- (x) 小型アミノ酸ファミリー：アラニン、セリン、スレオニン、メチオニン、グリシン

置換の例として、配列番号 2 において 176 番目の Arg 及び／又は 179 番目の Arg を、他のアミノ酸、好ましくは Ala、Gln 又は Trp に置換して切断が阻害又は抑制されたものが挙げられる。さらに、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、N 末側、C 末側又は両側のアミノ酸が 10 個以上欠失したもの（末端欠失型）も、本発明のポリペプチドに含まれる。末端欠失型の例として、配列番号 2 において C 末側の 20、40、45 又は 50 個のアミノ酸が欠失したもの、及び／又は N 末側 24 又は 33 個のアミノ酸が欠失したものが挙げられる。末端欠失型の態様を以下に示す。

N 末側のアミノ酸欠失数	C 末側のアミノ酸欠失数	配列番号 2 に示すアミノ酸配列の位置 (配列番号 1 の塩基番号)
N 末側 33 個	欠失なし	34-251(232-885)
N 末側 33 個	C 末側 20 個	34-231(232-825)
N 末側 33 個	C 末側 40 個	34-211(232-765)
N 末側 33 個	C 末側 45 個	34-206(232-750)
N 末側 33 個	C 末側 50 個	34-201(232-735)
N 末側 24 個	欠失なし	25-251(205-885) (配列番号 3 の第 1 番目～第 681 番目、 配列番号 4 に相当)
N 末側 24 個	C 末側 20 個	25-231(205-825)
N 末側 24 個	C 末側 40 個	25-211(205-765)
N 末側 24 個	C 末側 45 個	25-206(205-750)
N 末側 24 個	C 末側 50 個	25-201(205-735)
欠失なし	C 末側 20 個	1-231(133-825)
欠失なし	C 末側 40 個	1-211(133-765)
欠失なし	C 末側 45 個	1-206(133-750)
欠失なし	C 末側 50 個	1-201(133-735)

本発明においては、上記配列番号 2 に示すアミノ酸配列の部分断片（末端欠失型部分断片）のほか、これらの末端欠失型ポリペプチドにおいて 1 個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加した変異断片も本発明のポリペプチドに含まれる。ここで、上記一覧表において配列番号 2 に示すアミノ酸の位置番号の後に付した括弧内の数字は、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基の位置番号であり、これらの位置に示す塩基配列からなる DNA、又はこれらの DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズする DNA も本発明の DNA に含まれる。

本発明において、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも一部に変異を導入するには、該アミノ酸をコードする DNA の塩基配列に変異を導入する手法が採用される。

DNA に変異を導入するには、Kunkel 法若しくは Gapped duplex 法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができる。例えば、変異オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた部位特異的突然変異誘発法に基づいて変異を導入するが、変異導入用キット（例えば Mutan-K(TAKARA 社製)、Mutan-G(TAKARA 社製)、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキッ

トなど)を用いて変異を導入することもできる。

さらに、上記本発明の DNA (配列番号 1、3、5、7、9) から調製されるプローブとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、低リン血症誘導活性、リン輸送抑制活性、石灰化抑制活性又はビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチドをコードする DNA も、本発明の DNA に含まれる。プローブとは、配列番号 1、3、5、7 又は 9 に示す配列の全長又は長さが 17 塩基以上の連続する配列 (部分配列) に対し相補配列を有するものをいう。

ここで、ストリンジントな条件とは、ナトリウム濃度が 750mM 以上、好ましくは 900mM 以上であり、温度が 40℃以上、好ましくは 42℃の条件を満たすものをいう。具体的には、6×SSC、5×Denhardt、0.5% SDS、50% Formamide、42℃の条件をいう。なお、6×SSC とは、900mM NaCl、90mM クエン酸ナトリウムを意味する。デンハルト溶液 (Denhardt) とは、BSA (ウシ血清アルブミン)、ポリビニルピロリドン及び Ficoll400 を含む溶液であり、50×Denhardt は 1% BSA、1% ポリビニルピロリドン、1% Ficoll 400 の組成からなる (5×Denhardt は 50× Denhardt の 10 分の 1 の濃度を意味する)。

一旦本発明の DNA の塩基配列が決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いた PCR によって、本発明の DNA を得ることができる。

2. 本発明の DNA を含む組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の DNA を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の DNA を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA 等が挙げられる。

プラスミド DNA としては、大腸菌由来のプラスミド (例えば pBR322, pBR325, pUC118, pUC119 等)、枯草菌由来のプラスミド (例えば pUB110, pTP5 等)、酵母由来のプラスミド (例えば YEp13, YEp24, YCp50 等)などが挙げられ、ファージ DNA としては入ファージ等が挙げられる。また、レトロウイルス、アデノウ

イルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、あるいはバキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。さらに、GST、His-tag などが連結された融合プラスミドを用いることもできる。

ベクターに本発明の DNA を挿入するには、まず、精製された DNA を適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNA の制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

本発明の DNA は、その DNA の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の DNA のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列 (SD 配列) などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の DNA を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属に属する細菌、あるいはサッカロミセス・セレビスiae (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母が挙げられる、また、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞等の動物細胞や、Sf9、Sf21 等の昆虫細胞を用いることもできる。

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の DNA、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コ

リ(*Escherichia coli*) JM109、HB101 などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)などが挙げられる。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば trp プロモーター、lac プロモーター、PL プロモーター、PR プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来する T7 プロモーターなどが用いられる。tac プロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば gal1 プロモーター、gal10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1 プロモーター、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、AOX1 プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞 COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO 細胞)、マウス L 細胞、ラット GH3 細胞、又はヒト FL、HEK293、HeLa 若しくは Jurkat 細胞などが用いられる。プロモーターとして SR α プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、 β -アクチンプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9 細胞、Sf21 細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

3. 低リン酸血症誘導活性を有するポリペプチド

これまで腫瘍性骨軟化症における低リン酸血症誘導活性を有する腫瘍産生因子を単離同定する試みがいくつかなされてきた。そして、本発明のポリペプチドは、腫瘍性骨軟化症の腫瘍が産生する新規な分泌因子という特徴を有することが明らかにされた。この低リン酸血症を誘導する因子の推定される生物活性としては、以下の報告がされている。

リン酸の尿中への排泄促進作用：

Aschinberg, L.C. et al., *Journal of Pediatrics* 91:56-60, 1977、Lau, K. et al., *Clinical Research* 27:421A, 1979、Miyauchi, A. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:46-53, 1988)

腎尿細管上皮細胞のリン酸輸送活性の抑制：

Cai, Q. et al., *N. Engl. J. Med.* 330:1645-1649, 1994、Wilkins, G.E. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:1628-1634, 1995、Rowe, P.S.N. et al., *Bone* 18:159-169, 1996 25-ヒドロキシビタミン D-1 α -ヒドロキシラーゼ活性の抑制：
Miyauchi, A. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:46-53, 1988

特に、腎でのリン酸再吸収を抑制する活性を直接有する未知の分子を「Phosphatonin」と呼ぶことが提唱されている (Econs, M.J. & Drezner, M.K., *N. Engl. J. Med* 330:1679-1681, 1994)。このような生物活性を有する未知の因子の存在が XLH においても示唆されている。XLH 患者の臨床所見は、腫瘍性骨軟化症患者と共通して尿中リン酸排泄が亢進した低リン酸血症を特徴とし、骨組織の石灰化不全による骨軟化症やくる病を呈する。XLH の責任遺伝子は PHEX というエンドペプチダーゼ様蛋白質をコードしている遺伝子であることが明らかにされている。自然変異マウスである Hyp マウスは XLH と同様の表現形質を呈することが知られていたが、近年このマウスで PHEX をコードする遺伝子が部分欠失していることが明らかにされ、Hyp マウスは XLH のモデルとして位置付ける妥当性が示された (Strom, T.M. et al. *Human Molecular Genetics* 6:165-171, 1997)。Hyp マウスにおける低リン酸血症誘導因子が液性因子であることは、Hyp マウスと正常マウスとの並体癒合実験により明らかにされている (Meyer, R.A.

et al., J. Bone Miner. Res. 4:493-500, 1989)。この実験において正常マウスの血中リン酸濃度が低下して、尿中リン酸排泄が増加したことから、Hyp マウスに存在する体液性の低リン酸血症誘導因子が正常マウスに作用したものと考えられている。これまでのところ、ペプチドの切断活性が推定される PHEX とこの未知の低リン酸血症誘導因子との関連性は明らかではないが、PHEX が未知の低リン酸血症誘導因子の活性制御の関係や、腫瘍性骨軟化症における低リン酸血症誘導因子と XLH で認められる低リン酸血症誘導因子が同一である可能性についての仮説が提唱されている (Drezner, M.K. Kidney Int 57:9-18, 2000)。この仮説によると、PHEX 及び低リン酸血症誘導因子が、正常では同じ細胞で発現しており、PHEX が低リン酸血症誘導因子に対して抑制的に働く。XLH 患者においては、PHEX の機能が低下又は消失しているため、低リン酸血症誘導因子の活性が強く現れる。腫瘍性骨軟化症においては、PHEX 及び低リン酸血症誘導因子の両方が上昇しているが、結果的に活性型の低リン酸血症誘導因子が量的に正常値より増加すると仮定している。また、この低リン酸血症誘導因子は、腎臓におけるリン酸輸送担体の一つである NPT2 のリン酸輸送活性に対して抑制的に作用すると仮定している。このような未知の低リン酸血症誘導因子を探索する試みも多くなされているが、これまで分子の同定には至っていない。Cai らの研究によると、低リン酸血症誘導因子は、分子量が 8 kDa から 25 kDa の間にあると推察されているが (Cai, Q. et al., N. Engl. J. Med. 330:1645-1649, 1994)、Rowe らは候補分子として 56 kDa と 58 kDa の蛋白質を上げている。最近、Rowe らは WO99/60017 に 430 残基のアミノ酸からなるポリペプチドを腫瘍性骨軟化症の腫瘍由来のリン酸代謝調節因子として出願しているが、ここで開示されているポリペプチドは本来存在する蛋白質の部分配列であり、低リン酸血症誘導活性に関連する生物学的活性は開示されていない。最近、MEPE という名称でこの特許に開示されていた分子の全長に相当するポリペプチドが報告されたが、やはり低リン酸血症を誘導するような活性については開示されていない (Rowe, P.S.N. et al, Genomics 67:54-68, 2000)。また、この分子と本発明のポリペプチドの間に配列上、構造上の類似性は認められない。

上述のとおり、低リン酸血症を誘導する活性をもつ生理活性因子の存在が推定

されるものの、これまでその実体は明らかにされていなかった。本発明は、そのポリペプチドとしての実体を明らかにし、それをコードする遺伝子配列を明らかにした。そして、以下に記載するように、発明のポリペプチドを生産し、その生産物がリン酸代謝、カルシウム代謝、ビタミン D 代謝又は石灰化と骨格形成に調節因子として作用し、医薬組成物として有用であることを明らかにした。また、本発明の抗体が治療のみならず臨床検査、診断に有用であることを明らかにした。また、本発明のポリペプチドをコードする DNA が遺伝病の診断やリン酸代謝、カルシウム代謝、骨代謝の多型診断に有用であることを明らかにした。

本発明の低リン酸血症誘導活性を有するポリペプチドは、例えば配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 133 番～885 番を含む配列を、発現できる形態で適当な宿主細胞に導入して形質転換細胞を調製し、該形質転換細胞に導入した DNA を発現させることによって製造することができる。また、このように産生されたポリペプチドは、宿主が持つ蛋白質修飾機構により切断や糖鎖付加などのポリペプチド鎖の改変を受けることがある。

本発明のポリペプチドは、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、

硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で4～48時間行う。培養期間中、pHは6.0～8.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で誘導可能なT7プロモーターを有する発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、IPTG等を培地に添加することができる。また、インドールアクリル酸(IAA)で誘導可能なtrpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、IAA等を培地に添加することができる。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が挙げられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～10日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養後、本発明のポリペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、超音波処理、凍結融解の繰り返し、ホモジナイザー処理などを施して菌体又は細胞を破碎することにより目的のポリペプチドを採取する。また、本発明のポリペプチドが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から本発明のポリペプチドを単離精製することができる。

上述のようにXLHにおいてエンドペプチダーゼと考えられるPHEXが低リン酸血症誘導因子の調節に重要な意義を持つ事を考えると、本発明の配列番号2のアミノ酸配列を持つポリペプチドがさらに修飾、切断されて活性を変化させることも考えられる。本発明において、CHO ras-clone 1細胞を宿主として用いて、

発明のポリペプチド鎖の C 末端に His を 6 連続して付与した組み換え体を産生するクローン化した細胞株を作製した。この細胞株は独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に寄託した（受託番号 FERM BP-7273、原寄託日 平成 12 年 8 月 11 日）。

この細胞株に発明のポリペプチドを生産させ、培養液に分泌されたポリペプチドを調べたところ、図 2 に示すようにサイズの異なる遺伝子産物が His-tag を認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出された。それぞれのバンドに相当する蛋白質を単離して N 末端アミノ酸配列を実施したところ、それぞれ配列番号 4 と配列番号 8 に示すアミノ酸配列の N 末側の配列に一致した。前者はシグナル配列が除かれたあとの蛋白質と考えられ、後者は、エンドペプチダーゼ等の酵素により切断されたものと考えられる。

ところで、RXXR を認識する蛋白分解酵素の一つとして furin が知られており、実際 furin 欠損細胞株で本発明のポリペプチドを発現させたところ断片は検出されなかった。さらに、furin 阻害活性を有する組換え体蛋白 α 1-PDX を本発明のポリペプチドと共発現させたところ上清中の切断断片が著しく減少した。

従って、培養の際に、furin 欠損細胞を用いることを含む、または furin 活性を抑制する物質を共存させることを含む、本願ポリペプチドの生産方法も本発明に含まれる。

Cai らは、腫瘍性骨軟化症の腫瘍由来細胞を培養した培養上清中のリン輸送抑制活性が、透析膜による分画方法で 8 kDa から 25 kDa の分子量範囲にあることを示唆している。本発明の配列番号 4 のアミノ酸配列を持つポリペプチドが配列番号 2 の残基番号 179 番の Arg と 180 番の Ser との間で切断されたポリペプチドに変換されることで、その活性を変化させていることも考えられる。

本発明のポリペプチドは、表 2（実施例 7）に示すように、低リン酸血症誘導活性の一つの作用様態である腎臓近位尿細管上皮細胞のリン酸輸送活性を抑制する活性を有している。血中に存在する遊離型の無機リン酸の大部分は、腎臓の糸球体で濾過されるが、そのうちの 80～90% 程度が腎臓の近位尿細管で再吸収される。

この再吸収は、近位尿細管の管腔側に存在する II 型 Na 依存性リン酸トランス

ポーターによるリン酸輸送により行われる。本発明のポリペプチドがリン酸輸送活性を抑制する活性を有するということは、生体においてリン酸の尿中排泄を促進することを意味する。従って、本発明のポリペプチドは、腎臓でのリン酸再吸収の抑制、特に腎臓近位尿細管細胞のリン酸輸送を抑制する活性により低リン酸血症を誘導していると考えられることから、上述の Phosphatonin と同一物質であることが想定される。

近年、腸管における Na 依存性リン酸トランスポーターが同定され、このトランスポーターは、腎臓に存在する II 型の Na 依存性リン酸トランスポーターと相溶性が高いことから、IIb 型と命名された。腸管の管腔側にあるこの IIb 型 Na 依存性リン酸トランスポーターの抑制も、腎臓の II 型 Na 依存性リン酸トランスポーターと同様に本発明のポリペプチドが担当することが考えられる。これも低リン酸血症誘導活性の一つの作用様態と考えられる。

本発明のポリペプチドの *in vivo* での活性は、本発明のポリペプチドを発現する上述の組み換え体細胞をヌードマウスの皮下に移植する実験により評価した。

本試験において移植した細胞は、ヌードマウスの皮下において増殖して腫瘍を形成する。これに伴い細胞が生産し、分泌する本発明のポリペプチドはマウスの体液中に放出されることを特徴としており、当該放出により腫瘍性骨軟化症をモデル化することができる。このモデル実験において、表 4（実施例 11）に示すように、本発明のポリペプチドを発現する細胞を移植したマウスは、本発明の DNA を導入していない対照の CHO 細胞を移植して腫瘍を形成させた個体、又は腫瘍を形成していない個体と比較して、明らかな低リン酸血症を呈した。このことから、本発明のポリペプチドは低リン酸血症誘導活性を有していることが明らかとなった。また、リン酸の再吸収率も低下しており、腎臓でのリン酸の再吸収が抑制されていることも明らかとなった。これらのことから、本発明のポリペプチドは、腫瘍性骨軟化症における低リン酸血症誘導因子であると考えられた。

一方、上記モデル実験において、本発明のポリペプチドを産生する組み換え体細胞を移植したマウスでは低カルシウム血症が認められた。従って、本発明のポリペプチドは、低カルシウム血症誘導因子であることも明らかとなった。実施例 16 に記載した本発明のポリペプチドを発現する CHO 細胞のヌードマウスへの移

植試験において、持続的な血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度の減少が明らかとなった。また、実施例 19、20 に記載したとおり、変異導入ポリペプチドあるいは野生型全長ポリペプチドを正常マウスへ三回投与することで、いずれも血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を減少させることが明らかとなった。さらに、実施例 24 に記載したとおり、本発明のポリペプチドを単回投与後、数時間以内に血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度の減少を認めたことから、この低下活性は本発明のポリペプチドの主な生理作用の一つであると考えられる。

上述のごとく、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度は、 1α 位水酸化酵素および 24 位水酸化酵素により規定されている。実施例 16 に記載したとおり、本発明のポリペプチドの血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度低下作用には、これら代謝酵素の発現変動を伴うことが明らかとなった。さらに、実施例 24 に記載したとおり、本発明のポリペプチドを投与後 1 時間目において、活性型ビタミン D 合成酵素である 1α 位水酸化酵素遺伝子転写産物の減少、ならびに代謝酵素である 24 位水酸化酵素遺伝子転写産物の亢進を認めた。この発現変動の後に、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度が低下していくことから、本発明のポリペプチドによる血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度低下作用は、少なくとも 1α 位水酸化酵素遺伝子の発現抑制および 24 位水酸化酵素遺伝子の発現亢進が原因となっていることが示唆された。

一方、実施例 11 に記載した本発明のポリペプチドを発現する CHO 細胞のヌードマウスへの長期間移植試験(移植後 44 から 46 日目)において、 1α 位水酸化酵素遺伝子の発現は上昇していた。この時点でのマウス血清中 PTH 濃度は、対照群に比し有意に上昇していたことが判明しており、高レベルの PTH 作用による 1α 位水酸化酵素遺伝子の発現亢進が起こっていたことが推測される。しかし興味深いことに、PTH 存在下においても、24 位水酸化酵素遺伝子の発現は依然亢進されたままであることから、本発明のポリペプチドによる 24 位水酸化酵素遺伝子の発現制御には PTH の干渉が及んでいないことがわかる。実施例 11 に記載したとおり、本マウスは重度の低リン血症およびくる病様所見を示していたにも拘わらず、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度が上昇しない原因として、本発明のポリペプチドによる持続的な 24 位水酸化酵素遺伝子の発現亢進が影響している

ことが示唆された。

25-ヒドロキシビタミン D は、腎臓近位尿細管において再吸収を受けることが A. Nykjaer らによって明らかにされている(Cell, Vol.96, p507-515, 1999)。本明細書に記載はないが、本発明のポリペプチドを発現する CHO 細胞のヌードマウスへの移植試験において、25-ヒドロキシビタミン D の血清濃度に著明な変化を認めていない。また、本発明のポリペプチドの作用により、ナトリウム、カリウム、クロライドなどの主要電解質、主要アミノ酸、あるいはグルコースの分画排泄(尿中濃度/血清濃度/GFR で算出される)に影響を認めなかったことから、尿細管再吸収機能が障害されていないことを支持する(T.Shimada et al., Proc.Natl.Acad.Sci, in press)。従って、本発明のポリペプチドは、25-ヒドロキシビタミン D の尿細管における再吸収阻害の結果、血清中 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度低下を引き起こしているのではなく、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D の合成経路に特異的に作用していることが示唆された。

腫瘍性骨軟化症において、血清中 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度は著明に低下していることが知られている。また、低リン血症性ビタミン D 抵抗性くる病(XLH)あるいはその病態モデルマウスである Hyp では、重度の血清リン酸濃度低下にも拘わらず血清中 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度は正常範囲あるいはそのやや下限域である。また、Hyp マウスの 24 位水酸化酵素遺伝子の発現は亢進していることも知られている。これらの低リン血症を呈する病態では、本来、血清リン酸濃度の低下に伴い血清中 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を上昇させるべく上述の 1α 位水酸化酵素遺伝子の上昇が引き起こされるはずであるが、その制御システムのいずれかが破綻しており、正常な生理応答ができていないことが病態の原因の少なくとも一つであると考えられている。これらの現象は、実施例 11、19 あるいは 20 に記載したマウスでの生理応答と類似しており、本発明のポリペプチドが、上述の病態において、血清中 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D3 濃度を低下させるべく機能していることが強く示唆される。

本発明のポリペプチドを発現する組み換え体細胞を移植したマウスの骨組織における石灰化の程度は、対照群に比べて著しく低下していることが図 5 に示す X 線像より明らかである。胸郭の変形など、骨格形成に対する作用も認められた。

すなわち、本発明のポリペプチドは、骨組織の石灰化の抑制作用、又は骨組織からのカルシウムおよびリン酸の動員を促進する作用を有していると考えられる。この石灰化の低下は、血中のリン酸とカルシウムの両者が著しく減少したため二次的に骨組織の石灰化が抑制されたと考えることもできる。

Hyp マウスにおいては、腎臓の近位尿細管でのリン酸輸送活性を抑制する因子を骨由来細胞が産生していると考えられている (Lajeunesse, D. et al., *Kidney Int.* 50:1531-1538, 1996)。また、Hyp マウスの骨芽細胞が石灰化抑制因子を放出していることが報告されている (Xiao, Z. S., *Am. J. Physiol.*, E700-E708, 1998)。上述のとおり、XLH と腫瘍性骨軟化症では、低リン酸血症と骨組織の石灰化不全という臨床所見が酷似することと、これらが単一の液性因子により誘導される可能性が高いことを考え合わせると、この Hyp マウスの研究で報告されている腎臓のリン酸輸送抑制活性と骨石灰化抑制活性は、同一の因子により引き起こされている可能性がある。また、Hyp マウスの骨芽細胞は、カルシウムとリン酸が正常域にある状況でも骨形成の異常を呈することが報告されている (Ecarot, B. et al., *J. Bone Miner. Res.* 7:215-220, 1992)。本発明のポリペプチドは、上記の Hyp マウスで想定されている因子と同様の活性を有しており、低リン酸血症誘導活性以外にカルシウムやリン酸代謝を介さずに直接骨組織の石灰化を調節する作用を有していることが考えられる。

本発明を完成させる過程において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子とともに、実施例 3 の表 1 に示すようにデンチンマトリックス蛋白質-1 (DMP-1) が取得された。この遺伝子は、歯の象牙質にて多く発現し、コードされている蛋白質は象牙質の細胞外基質蛋白質として象牙質の石灰化基質の形成に重要な役割を有していると考えられる。同様にマトリックス細胞外リン酸化蛋白質 (MEPE) をコードする遺伝子を OST190 として取得した。この分子の機能の詳細については知られていない。また、同様にオステオポンチンをコードする遺伝子も得られている。MEPE、DMP-1、オステオポンチンは RGD モチーフ配列を有するリン酸化蛋白質である点で共通しており、リン酸化されうるセリン、スレオニンに富み、また、酸性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸の含有率も高く、

強度の酸性蛋白質の性質を示すという特徴を有する。MEPE と DMP-1 の間では、ASARM 配列と命名された特徴的な酸性領域が保存されており (Rowe, P.S.N. et al, Genomics 67: 54-68, 2000)、両者の生理的あるいは機能的意義の類似性が示唆されている。このような、特徴的な蛋白質の機能の一つとして、石灰化の開始における無機カルシウム塩やリン酸塩との相互作用が考えられている。オステオポンチンの遺伝子発現は骨芽細胞、破骨細胞に加えマクロファージなど幅広く報告されている。一方、DMP-1 に関しては近年、骨組織での発現、とくに骨細胞での発現が報告されている。MEPE の遺伝子発現は骨髄組織での発現や SaOS-2 といった骨肉腫細胞での発現が知られている。このような石灰化組織で認められる酸性マトリックス蛋白質が本発明の過程において本発明のポリペプチドとともに見出されたことは、本発明のポリペプチドが有する作用様式の一面を示していると考えられる。すなわち、本発明のポリペプチドが上記分子に代表される石灰化組織に特徴的な分子の発現を誘導し、協調的に石灰化やカルシウム代謝やリン代謝を調節する可能性や誘導された分子が2次的に、石灰化やカルシウム代謝やリン代謝を調節する可能性が考えられる。また、本発明のポリペプチドが、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞に直接作用して骨代謝を制御しうることが考えられ、骨粗鬆症に代表される代謝性骨疾患の治療に有効性を示すことが考えられる。

近年、異所性石灰化部位で骨芽細胞様の表現形質をもつ細胞が出現し、骨組織での石灰化過程と同様の機序により石灰化がおこることが示唆されている。従って、本発明のポリペプチドが、このような石灰化細胞の出現や機能を抑制することで、異所性石灰化の治療に有効であることも考えられる。

本発明においては、上記ポリペプチドを修飾することもできる。例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ (N-ビニルピロリドン)、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドのコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコールなどを適宜選択して使用する。修飾方法は、公知の任意の手法を採用することができ、例えば特表平 10-510980 号公報に詳細に開示されている。

4. 本発明のポリペプチドに対する抗体

本発明の抗体は、上記本発明のポリペプチドと特異的に反応する。本発明において「抗体」とは、抗原であるポリペプチド又はその断片に結合し得る抗体分子全体またはその断片(例えば、Fab 又は $F(ab')_2$ 断片)を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明の抗体は、常法に従って調製することができ、例えば、アジュバントとともに抗原で動物を一回あるいは数週間間隔で複数回追加免疫する生体内(in vivo)の方法、免疫細胞を分離して適当な培養系で感作させる生体外(in vitro)の方法のいずれかの方法によって調製し得る。本発明の抗体を産生し得る免疫細胞としては、例えば脾細胞、扁桃腺細胞、リンパ節細胞などがあげられる。

抗原として使用するポリペプチドは、必ずしも上記の本発明のポリペプチド全体を使用する必要はなく、該ポリペプチドの一部分を抗原として使用してもよい。抗原が短いペプチド、特にアミノ酸 20 残基前後の場合は、キーホールリンペットヘモシアニンや牛血清アルブミンのような抗原性の高いキャリアタンパク質と化学修飾などによって結合させて用いるか、あるいは、キャリアタンパク質のかわりに分枝骨格を持つペプチド、例えばリジンコア MAP ペプチド(Posnett et al., J. Biol. Chem. 263, 1719-1725, 1988; Lu et al., Mol. Immunol. 28, 623-630, 1991; Briand et al., J. Immunol. Methods 156, 255-265, 1992) と共有結合させて用いる。

アジュバントは、例えば、フロイントの完全、または不完全アジュバントや水酸化アルミニウムゲルなどが用いられる。抗原を投与する動物としては例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、モルモット、ハムスターなどが用いられる。

ポリクローナル抗体は、これらの免疫された動物から血液を採取して血清を分離し、硫酸沈澱、陰イオン交換クロマトグラフィーまたはプロテイン A 若しくは G クロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて免疫グロブリンを精製して得られる。上記動物がニワトリの場合は、卵から抗体を精製することもできる。

モノクローナル抗体は、例えば in vitro で感作した、あるいは上記動物の免疫細胞を培養可能な親細胞と融合させて作製したハイブリドーマ(hybridoma) 細

胞の培養上清から、又は同ハイブリドーマ細胞を動物腹腔内接種して得られる腹水から精製して調製することができる。親細胞としては、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態では HAT 選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。例えば X63、NS-1、P3U1、X63.653、SP2/0、Y3、SKO-007、GM1500、UC729-6、HM2.0、NP4-1 細胞などがあげられる。

モノクローナル抗体を作製するための具体的手法は以下の通りである。

前記のようにして作製したポリペプチド又はその断片を抗原として、前記動物に投与する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、アジュバントを用いて 1~100 μg である。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 1~3 週間間隔で、1~10 回、好ましくは 2~5 回免疫を行う。そして、最終の免疫日から 1~10 日後、好ましくは 1~4 日後に抗体産生細胞を採集する。

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞と親細胞(ミエローマ細胞)との細胞融合を行う。細胞融合は、血清を含まない DMEM、RPMI-1640 培地などの動物細胞培養用培地中で、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個/ml の抗体産生細胞と $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 個/ml のミエローマ細胞とを混合し(抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比 5:1 が好ましい)、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量 1000~6000 ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

次に、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に 5×10^5 個/well 程度まき、各ウエルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14 日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。増殖

してきたハイブリドーマの培養上清中に、本発明のポリペプチドに反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。

また、*in vitro* で感作した、あるいは上記動物の免疫細胞に EB ウイルスなどの適当なウイルスを感染させ、得られる不死化抗体産生細胞を培養することにより調製することもできる。

これら細胞工学的手法とは別に、*in vitro* で感作した、あるいは上記動物の免疫細胞から抗体遺伝子を PCR(polymerase chain reaction)反応によって増幅して取り出し、大腸菌等の微生物に導入して抗体を産生させたり、抗体を融合タンパク質としてファージ表面に発現させるなど、遺伝子工学的手法により得ることもできる。

本発明の抗体を用いて、生体における本発明のポリペプチドを定量する事により、本発明のポリペプチドの各種疾患の病態との係わりを解明する事が出来、さらに同抗体は疾患の診断ひいては治療、且つ本発明のポリペプチドの効率的なアフィニティー精製に資する事が出来る。

本発明のポリペプチドが過度に作用することで、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D の低下を引き起こすことが主たる原因である疾患の存在が想定される。例えば、低リン血症性ビタミン D 抵抗性くる病(XLH)では重度な低リン血症を呈するにも拘わらず、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度は上昇を認めない。その理由は、ビタミン D 代謝酵素遺伝子群の異常が想定されているが、この疾患において本発明のポリペプチドの過剰作用が関与している可能性がある。XLH のマウスモデルである Hyp では、24 位水酸化酵素遺伝子の発現亢進が報告されており、本発明のポリペプチドの 24 位水酸化酵素遺伝子発現亢進作用と一致する。従って、本発明のポリペプチドに対する抗体を投与することで、ビタミン D 代謝を正常化し、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度を是正することで本疾患を治療できることが期待される。XLH の類似の所見を呈する疾患として常染色体優性遺伝性低リン血症くる病(ADHR)がある。我々は本発明のポリペプ

チドのクローニングに際して、その染色体上の位置より、本ポリペプチドをコードする遺伝子が ADHR の責任遺伝子であろうと推察していた。最近、ADHR の責任遺伝子の解析がなされ、本ポリペプチドをコードする遺伝子のミスセンス変異が原因であることが報告された。我々はさらにこの変異が酵素的切断に対して耐性を与えるものであることを明らかにし、この分子の過剰作用が疾患の原因であることを示した。この疾患に対して、本発明のポリペプチドに対する抗体がその作用を抑制することで疾患治療に有用であることが考えられる。ADHR が骨軟化症やミネラル代謝異常、ビタミン D 代謝異常を呈することから、このような代謝経路が関係する代謝性骨疾患において、本発明のポリペプチドが病因の一つとして作用している疾患の存在が推察され、そのような疾患に対して、本発明のポリペプチドに対する抗体が有効であることが期待できる。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D の作用の一つとして、脂肪細胞への分化抑制が知られている。加齢に伴い骨髄中の脂肪細胞が増加することが知られているが、骨髄中に存在する骨芽細胞、脂肪細胞および造血支持細胞の共通の前駆細胞から、脂肪細胞への分化が亢進していると考えられる。この過程において本発明のポリペプチドが過度に作用して、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D の局所における濃度を低減している可能性が考えられる。従って、本発明のポリペプチドに対する抗体を用いることで血中あるいは局所の $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を増加させ、脂肪細胞への分化を抑制し、骨形成能や造血能の低下を改善することが期待できる。また、肥満に対しても有効であることが期待される。このような、本発明のポリペプチドが関与する疾患は他にも存在することが考えられる。このような疾患は、本発明のポリペプチドに対する抗体を組み合わせた ELISA に代表される免疫学的な物質定量法にてスクリーニングすることができる。これにより、本発明のポリペプチドの生理的な正常範囲を設定することができ、またその範囲から逸脱する疾患群を明らかにすることができる。このようにして認められる本発明のポリペプチドの血中濃度が異常高値を示す疾患に対して、本発明のポリペプチドに対する抗体を治療的に使用することが期待できる。

5. 医薬組成物

(1) 本発明のポリペプチドを含む医薬組成物

本発明のポリペプチドは、血中リン酸濃度の上昇が好ましくない疾患に対して医薬組成物として用いることができる。慢性腎不全においては、腎からのリン酸の排泄量が減少により、血中のリン酸濃度の上昇がおこる。高リン酸血症が腎機能をさらに増悪させるとともに、副甲状腺からの副甲状腺ホルモンの分泌を促進して二次性副甲状腺機能亢進症を引き起こす。本症は、皮膚の掻痒を起こすとともに、腎臓での $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 合成障害による腸管からの Ca 吸収の低下をもたらす。また、血中リン酸の貯留による副甲状腺ホルモンの過分泌状態が、骨組織からの Ca 動員を促進する。この状態が続くと腎性骨異栄養症の様態の一つである線維性骨炎や副甲状腺の過形成を生じる。この状態を回避する好ましい方法の一つが、前述の高リン酸血症の改善であるが、現在の医療では高リン酸血症を十分に制御できていない。本発明のポリペプチドは、排尿機能が残存するまでの慢性腎不全において、腎臓近位尿細管上皮細胞に存在する II 型 Na 依存性リン酸トランスポーターを抑制して尿中へのリン酸排泄を促進することで、血中のリン酸を是正する活性を有する（リン酸輸送抑制活性）。また本発明のポリペプチドは腸管に作用して、腎臓と同様に II b 型 Na 依存性リン酸トランスポーターを抑制することでリン酸の体内への吸収も低下させ、血中リン酸濃度を是正させることができる。

本発明のポリペプチドはまた、カルシウム代謝とリン酸代謝の異常による疾患に対し医薬組成物として用いることができる。カルシウム代謝異常とは、血清カルシウム濃度が臨床上定義されている正常域を逸脱している状態、あるいは、血清カルシウム濃度は正常域であるが、この血清カルシウム濃度を保つために腎臓、腸管、骨組織、副甲状腺の機能が異常に亢進又は低下している状態、あるいは、副甲状腺ホルモン、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 、カルシトニンといった血清カルシウムを調節するホルモンが異常値を示す状態を意味する。また、リン酸代謝異常とは、血清リン酸濃度が臨床上定義されている正常域を逸脱している状態、あるいは、血清リン酸濃度は正常域であるが、腎臓、腸管、骨組織におけるリン酸出納機能が異常に亢進又は低下している状態を意味する。

上述の二次性副甲状腺機能亢進症に伴う腎性骨異栄養症は、臨床においては線維性骨炎のほかに無形成骨やその混合型など多様な形態をとる。これは、二次性副甲状腺機能亢進症に対して、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ 又は 1α -ヒドロキシビタミン D₃ などが、副甲状腺ホルモンを抑制する目的で一般に用いられている。副甲状腺ホルモン値が十分抑制されない場合は、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ 又は 1α -ヒドロキシビタミン D₃ の投与の過剰量を投与するパルス療法（以下、「ビタミン D パルス療法」ということがある。）が行われることがある。血清の副甲状腺ホルモンの正常濃度は 65 pg/ml 以下であるが、この病態において副甲状腺ホルモンの濃度が正常値レベルであるときは、腎性骨異栄養症の一つの様態である無形成骨を生じる。しかも、副甲状腺ホルモン濃度が上昇すると線維性骨炎を生じるといった相反する病態を示す。このような疾患に対する最近の治療指針としては、副甲状腺ホルモン濃度を 130~260 pg/ml 程度に維持することが提唱されているが、根本的な代謝異常の原因は不明のままである。副甲状腺ホルモンは、血中リン酸濃度の上昇により誘導され、血清カルシウムの上昇により抑制されることが知られている。本発明のポリペプチドは、血中リン酸濃度および血中カルシウム濃度を低下させることから、副甲状腺ホルモンの機能を修飾することが推察できる。また、腫瘍性骨軟化症患者において、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ が検出限界以下まで低下することが報告されており、本発明のポリペプチドが $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ の活性調節に関連していることも推察できる。上述の副甲状腺ホルモンの制御異常や活性異常に伴う腎性骨異栄養症において、本発明のポリペプチドが無形成骨又は線維性骨炎のいずれかに対して臨床上有用な医薬組成物として利用できることが考えられる。従って、腎性骨異栄養症の線維性骨炎と無形成骨といった相反する病態のいずれかにおいて、本発明のポリペプチドの投与が有用な治療方法を提供することが考えられる。

さらに、本発明のポリペプチドは、異所性石灰化に対し医薬組成物として用いることができる。骨組織以外の組織における石灰化は、生体機能を損なうものである。特に心臓や血管の石灰化による機能不全は生命を脅かすものである。この異所性石灰化の危険因子としては、血中のカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度の積（以下、「カルシウムーリン積」ということがある。）が上昇することが挙

げられる。上述の二次性副甲状腺機能亢進症の治療において、高リン酸血症の状態に対してビタミン D パルス療法を行う際に、カルシウムーリン積が上昇して異所性石灰化を起こす場合がある。また、血液透析患者における心血管系の石灰化は重大な問題である。本発明のポリペプチドは、表 4 に示すように、血清のカルシウム濃度とリン酸濃度を顕著に低下させる活性を有しており、種々の疾患に付随する異所性石灰化に対して有効であることが期待できる。

さらに、本発明のポリペプチドは、代謝性骨疾患に対し医薬組成物として用いることができる。本発明のポリペプチドは、カルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミン D 代謝に対して強力な調節活性を有している。カルシウム代謝とリン代謝に関連するホルモンとしては、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ がある。カルシトニンは血清カルシウムを低下させる活性を有し、副甲状腺ホルモンと $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ は、血清カルシウムを上昇させる活性を有している。副甲状腺ホルモンは尿中へのリン酸排泄作用を有しており、カルシトニンにも同様の活性があることが報告されている。 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ は、腸管からのリン酸の吸収を促進する活性を有する。このように、それぞれのホルモンが血中のカルシウムとリン酸のバランス維持に対して異なる活性を有しているが、カルシトニン及び $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ は骨粗鬆症の治療薬として使用されている。また、副甲状腺ホルモンも骨粗鬆症に対する治療薬として開発中である。

骨代謝には、骨吸収と骨形成という骨組織の異化と同化が相互調節しているという特徴がある。副甲状腺ホルモンを持続的に投与すると骨量を減少させるが、間歇的に作用させることにより骨形成を促進することが知られている。本発明のポリペプチドも、カルシウム代謝とリン酸代謝の調節作用を有していることから、適切な使用方法を選択することで骨粗鬆症をはじめ代謝性骨疾患に対して有効であることが期待できる。

さらに、本発明のポリペプチドは、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度の上昇が好ましくない疾患又は状態に対して、あるいは、血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D によって誘導される生理応答が好ましくない状態に対して、医薬組成物として用いることができる。

1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D は副甲状腺に対して作用し、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌を抑制する事が知られている。そのため臨床では慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症、とりわけ血清中 PTH 濃度が高い症例において、間欠的に高濃度の 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D を投与する治療法が確立している。しかしこの治療法の短所として、異所性石灰化を誘発しやすい点が上げられる。血清中リン酸濃度が高い慢性腎不全患者において、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D の投与により骨組織以外の組織における好ましくない石灰化がしばしば認められる。本発明のポリペプチドの投与は数時間以内に速やかな血清中 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D の低下を促す作用を有することから、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D の過剰が原因となる異所性石灰化の治療および予防に有用である。

また、高濃度 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D の間欠的投与は過度の PTH 分泌抑制をもたらし、骨の代謝が停止したような所見を呈する無形成骨症を誘発することがある。このような症例に対しても、本発明のポリペプチドの投与により、血清中 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D を低下させ、副甲状腺における適切な PTH 分泌を促し、無形成骨からの回復をもたらすことが期待できる。

血管の石灰化においても 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D が石灰化促進因子として関与していることが報告されている。本発明のポリペプチドは血管の石灰化を伴う病態、例えば加齢による動脈硬化、糖尿病性血管症、透析患者による心血管系の石灰化などに対して治療的あるいは予防的に用いることができる。

腸管からのカルシウム吸収は血清中 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D により促進されることが知られている。本発明のポリペプチドは、血清中 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度を低下させることにより、高カルシウム血症の是正に用いることができる。高カルシウム血症の原因としては、原発性副甲状腺機能亢進症による PTH の過剰産生、サルコイドーシスや結核などの慢性肉芽腫に伴った高濃度 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D、あるいは悪性腫瘍が産生する PTHrP による骨吸収促進などが挙げられる。1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D 過剰だけでなく PTH 又は PTHrP が主な原因である高カルシウム血症において、本発明のポリペプチドを投与することにより、血清中 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度を低

下させることで高カルシウム血症を改善することが期待できる。特に、サルコイドーシスや結核などの慢性肉芽腫中の活性化マクロファージは 1α 位水酸化酵素活性を有しており、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ を過剰産生する。本発明のポリペプチドにより、この 1α 位水酸化酵素活性を直接低下させることが期待される。

$1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、破骨細胞の分化を促進することが知られており、本発明のポリペプチド投与により骨吸収抑制が期待される。in vitro において、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は強力な破骨細胞分化誘導因子として知られている。破骨細胞による過度な骨吸収は、骨粗鬆症に代表される骨減少疾患を招く。本発明のポリペプチドは、このような骨吸収の促進が認められる疾患において、一過性に血清中 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を低下させることにより、骨代謝回転を正常に戻すことが期待される。また、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D は in vitro で骨芽細胞の分化を抑制することが報告されているが、in vivo においても骨形成を抑制する因子であることがビタミン D 受容体欠損マウスの骨移植実験で示唆されている。このような観点からも、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D を低下させうる本発明のポリペプチドは骨量の減少を伴う代謝性骨疾患に対して有用であることが期待できる。また、ビタミン D₃ 代謝物の一つである、 $24,25$ -ジヒドロキシビタミン D を投与することにより、骨量の増加を認める報告がなされている。 $24,25$ -ジヒドロキシビタミン D は、 25 -ヒドロキシビタミン D を基質として 24 位水酸化酵素が水酸化を行うことで合成される。本発明のポリペプチドは、 24 位水酸化酵素遺伝子の発現を有意に亢進させる作用を有しているため、本ペプチドの投与により、血中 $24,25$ -ジヒドロキシビタミン D 濃度を上昇させ、骨粗鬆症などの骨疾患、あるいは骨格形成異常などに対する骨量の増加を期待することができる。

PTH は強力な骨吸収促進作用を有することが知られているが、これを間歇投与することで骨代謝回転を刺激することができ、結果的に骨量を増加させる効果を発現させることができる。本発明のポリペプチドの生理活性として、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D の調節作用や血清カルシウム、血清リン酸濃度調節作用、石灰化調節作用を有することが明らかとなっているが、本ポリペプチドを効果的

に骨組織に作用させることで骨代謝回転を調節することは可能であると考えられる。従って、骨代謝回転が亢進している閉経後骨粗鬆症や骨代謝回転が低下している退行期骨粗鬆症に対して本ポリペプチドが有用であることが期待できる。このような、本発明のポリペプチドが関与する疾患は他にも存在することが考えられる。この様な疾患は、本発明のポリペプチドに対する抗体を組み合わせたELISA に代表される免疫学的な物質定量法にてスクリーニングすることができる。

これにより、本発明のポリペプチドの生理的な正常範囲を設定することができ、またその範囲から逸脱する疾患群を明らかにすることができる。このようにして認められる本発明のポリペプチドの血中濃度が異常低値を示す疾患に対して、本発明のポリペプチドを治療的に使用することが期待できる。

(2) 本発明の抗体を含む医薬組成物

本発明の抗体は、ビタミンD抵抗性くる病や腫瘍性骨軟化症に対し、医薬組成物として用いることができる。上述の抗体の調製方法により本ポリペプチドの中和抗体をポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として取得することができる。抗体を医薬としてより適正に用いる方法としては、ヒト型抗体やヒト型化抗体を作製することが可能である。腫瘍性骨軟化症における低リン酸血症や骨軟化症の治療又は改善は本発明のポリペプチドの過剰な活性を抑制することで達成できる。本発明のポリペプチドに対する中和抗体を投与することにより腫瘍性骨軟化症の症状改善が期待できる。また、XLHにおける低リン酸血症誘導因子や石灰化抑制因子が本発明のポリペプチドと同等であると考えられ、XLHを含むビタミンD抵抗性くる病に対する治療薬にもなり得る。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドが過剰状態に存在するカルシウム代謝又はリン酸代謝異常疾患や代謝性骨疾患に対し、医薬組成物として用いることができる。上述にあるように、慢性腎不全患者や血液透析患者においてはカルシウム代謝やリン酸代謝の恒常性維持機構に異常が生じているが、本発明のポリペプチドが過剰産生や蓄積が原因である可能性がある。本発明のポリペプチドが骨代謝を調節することを示したが、本発明のポリペプチドが過剰に存在することで生

じる代謝性骨疾患の存在も考えられる。この場合に本発明のポリペプチドに対する抗体により病態の治療又は改善が期待できる。

本発明の抗体を適用し得る疾患は、骨粗鬆症、ビタミンD抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病、腫瘍性骨軟化症などの少なくとも1種の骨疾患が挙げられる。これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよい。

(3) 投与プロトコール

本発明のポリペプチド又は抗体を有効成分として含む医薬組成物は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

本発明のポリペプチド又は抗体を骨疾患の予防剤又は治療剤として使用する場合は、使用する対象を特に限定するものではない。

本発明のポリペプチドについては、生体のカルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミンD代謝を調節し得る医薬組成物として使用することができる。

本発明の抗体については、上記のとおり骨粗鬆症、ビタミンD抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病、腫瘍性骨軟化症などの少なくとも1種の骨疾患について治療又は予防を特異目的として用いることができる。これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであっても、本発明のポリペプチド又は抗体の使用の対象とすることができる。

本発明のポリペプチド又は抗体を含む予防剤又は治療剤は、ポリペプチドにあっては経口的又は非経口的に、抗体にあっては非経口的に投与することができる。

本発明のポリペプチドを経口的に投与する場合は、それに適用される錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤などの固形製剤、あるいは液剤、シロップ剤などの液体製剤等とすればよい。特に顆粒剤及び散剤は、カプセル剤として単位量投与形態とすることができ、液体製剤の場合は使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。

これら剤形のうち経口用固形剤は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤などの添加剤を含有する。また、経口用液体製剤は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される安定剤、緩衝剤、矯味剤、保存剤、芳香剤、着色剤などの添加剤を含有する。

本発明のポリペプチド又は抗体を非経口的に投与する場合は、注射剤、坐剤等とすることができる。

注射の場合は、通常単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供され、使用する際に適当な担体、例えば発熱物質不含の滅菌した水で再溶解させる粉体であってもよい。これらの剤形は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される乳化剤、懸濁剤などの添加剤を含有する。注射手法としては、例えば点滴静脈内注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、皮内注射が挙げられる。また、その投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。

この場合、本発明のペプチド又は抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、ポリペプチドにあっては、一回につき体重 1kg あたり 0.01~100 μ g、好ましくは 0.5~20 μ g である。また、抗体にあっては、一回につき体重 1kg あたり 0.1 μ g~2mg、好ましくは 1~500 μ g である。

6. 疾患の診断剤

(1) 本発明の抗体又はポリペプチド

本発明の抗体は、血中や尿中に存在する本発明のポリペプチドあるいはその代

謝物の検出や定量に用い、本発明のポリペプチドと病態の関連性をあきらかにすることができるとともに、関連疾患の診断剤として確立できる。

関連疾患とは、骨疾患またはカルシウム代謝異常、リン酸代謝異常、石灰化異常、及びビタミン D 代謝異常のうち少なくとも 1 つの異常を呈する疾患を意味し、例えば骨粗鬆症、ビタミン D 抵抗性くる病、腎性骨異常栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病、腎不全、腎性リン酸漏出症、尿細管性アシドーシス、ファンコニ症候等が挙げられる。

抗体を用いた結合分子の定量方法は、ラジオイムノアッセイやエンザイムイムノアッセイなどにより一般化している。このような方法を用いて、血中や尿中の本発明のポリペプチドを測定することは、新たな臨床判断の指標となり得る。例えば、くる病患者において、本発明のポリペプチドの血中値が健常人と比較して高値を示す場合には、XLH 又は ADHR を強く疑うことができる。また、本発明のポリペプチドの血中濃度の変化により慢性腎不全患者の二次性副甲状腺機能亢進症への進展を予想できる。

腫瘍性骨軟化症については、一般に腫瘍の発見が容易でない場合が多いが、本発明の抗体を用いることで有用な診断方法が確立できる。例えば、くる病や骨軟化症の家族歴がない患者において、血中の本発明のポリペプチド濃度が健常人と比較して著しい高値を示した場合、腫瘍性骨軟化症を疑うことができる。

(2) 本発明の DNA

本発明においては、リン酸代謝異常疾患やカルシウム代謝異常疾患および代謝性骨疾患患者から本発明の DNA 異常を検出することにより、当該疾患の診断と予防を可能にする。

本発明の DNA の塩基配列を Genbank の塩基配列データベース中でサーチすると、3 つに断片化した状態で、ヒト 12p13 BAC RPCI11-388F6 (アクセッション番号 AC008012) の配列と一致する。この断片化は、染色体配列からスプライシングにより本発明の DNA の塩基配列が得られることを示しており、本発明のポリペプチドをコードする DNA は、少なくとも配列番号 11 に示す配列のうち第 498 番から第 12966 番までの配列又はその一部の断片を含むことが明らかである。

この領域内の塩基の置換や挿入や欠失により、本発明のポリペプチドの生物学的および生理的活性の上昇や低下や消失が起こる。本発明のポリペプチドは、リン酸代謝、カルシウム代謝、骨代謝、ビタミン D 代謝に強力な作用を有することから、この配列番号 11 に示す塩基配列又はその一部の領域（例えば第 498 番から第 12966 番までの配列）において、一部の塩基の置換、挿入、欠失などによる遺伝子多型や変異を明らかにすることにより、リン酸代謝異常やカルシウム代謝異常を含む疾患、あるいは骨代謝異常を呈する疾患、ビタミン D 代謝異常を呈する疾患の診断、予防が可能となる。

ところで、ADHR を有する家系の連鎖解析がなされ、その責任遺伝子が 12p13 に存在することが報告されている（Econs, M.J. et al., J. Clin. Invest. 100:2653-2657, 1997）。この報告において、責任遺伝子がマイクロサテライトマーカー D12S100 と D12S397 の 18 cM の範囲に存在することが明らかにされている。本発明者は、本発明の DNA が存在する染色体上の位置をこれらと比較して確認したところ、本発明のポリペプチドをコードする DNA は、ADHR の責任遺伝子が存在する領域と一致した。本発明のポリペプチドの生物活性と遺伝子の染色体上の位置から、本発明のポリペプチドが ADHR の責任遺伝子によりコードされていると考えられる。このことは、ADHR 患者の血液より細胞成分を分離して、これより染色体 DNA を単離して、配列番号 11 に示されている領域の塩基配列の変異を見つけることで確定することができる。従って、上記塩基配列領域を有する遺伝子は、常染色体優性低リン酸血症性くる病、伴性染色体性低リン酸血症性くる病、低リン酸血症性骨症、骨粗鬆症等の診断剤として使用される。

本発明者が特定した本発明のポリペプチドをコードする DNA 領域の exon 1 と exon 2 との間には、NCBI の Genbank にアクセッション番号 G19259 で登録されている STS 配列が存在する。このマーカーは本 DNA と遺伝的形質との関連性を調べる上で非常に重要であると考えられる。

本発明は、これまでのカルシウム代謝、リン酸代謝、骨代謝及びビタミン D 代謝に対する理解に大きな変革をもたらす。慢性腎不全から血液透析期の移行遅延やリン酸代謝とカルシウム代謝関連疾患や代謝性骨疾患に対する新しい治療法と診断方法を提供する。また、既存の治療方法の改善やそれを補助するものとして

有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、OST311 の腫瘍特異性を検討するため、腫瘍組織より抽出した first-strand cDNA および対照骨組織より抽出した first-strand cDNA を鋳型に、配列番号 22、23 に示す OST311 特異的プライマーおよび、配列番号 26、27 に示す G3PDH 特異的プライマーを用いて PCR を実施し、その増幅産物をアガロース電気泳動で解析した写真である。

図 2 は、組換え OST311 を、ニッケルレジンにてアフィニティー精製した後、強陽イオン交換樹脂 SP-5PW で分離精製した溶出画分について、ウェスタンブロッティングを実施し OST311 を検出したことを示す写真である。

図 3A は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを、MacVector version 6.5.1 の計算機能を用いて、ペプチド抗体作製に適した部位を予測した結果を示す図である。

図 3B は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを、MacVector version 6.5.1 の計算機能を用いて疎水性度を予測した結果を示す図である。

図 4 は、CHO-OST311H 細胞を移植してから 31 日間の、非腫瘍形成群 (avr.- で表示されたグラフ) および CHO-OST311H 細胞腫瘍形成群 (avr.+ で表示されたグラフ) の平均体重の経時変化を示した図である。

図 5 は、対照 CHO ras clone-1 細胞腫瘍形成個体、CHO-OST190H 細胞腫瘍形成個体、CHO-OST311H 細胞腫瘍形成個体をそれぞれ X 線撮影し、全身骨格を示した写真である。

図 6 は、ヒト OST311 ポリペプチドとマウス OST311 のポリペプチドとの間におけるアミノ酸の相同性を比較した結果を示す図である。

図 7 は、腫瘍非形成群 (n=6)、CHO ras clone-1 腫瘍形成群 (n=10)、CHO-OST190H 腫瘍形成群 (n=10)、CHO-OST311H 腫瘍形成群-1 (n=6)、CHO-OST311H 腫瘍形成群-2 (n=6) より 44 日目～46 日目に心採血にて採取した血清中のリン濃度、カルシウム濃度、アルカリホスファターゼ活性を測定した結果を示した図である。

図 8 は、CHO-OST311H 腫瘍形成個体および非腫瘍形成個体より摘出した腎臓から、近位尿細管上皮細胞冊子縁膜を調製し、ナトリウム・リン酸共役輸送担体 (NaPi-7) の発現量をウェスタンブロッティング法で比較した写真である。

図 9A は、腫瘍移植後 44 日目～46 日目に屠殺したマウスより採取した腎臓におけるリン酸輸送担体 (NaPi-7、NPT-1) とビタミン D 代謝酵素 (1α OHase、24OHase) と小腸におけるリン酸輸送担体 (NaPi-IIb) の mRNA 量の変化をノーザンブロッティングで検出した写真である。

図 9B は、腫瘍移植後 44 日目～46 日目に屠殺したマウスより採取した腎臓におけるリン酸輸送担体 (NaPi-7、NPT-1) とビタミン D 代謝酵素 (1α OHase、24OHase) と小腸におけるリン酸輸送担体 (NaPi-IIb) の mRNA 量の変化をノーザンブロッティングで検出した写真である。

図 9C は、腫瘍移植後 44 日目～46 日目に屠殺したマウスより採取した腎臓におけるリン酸輸送担体 (NaPi-7、NPT-1) とビタミン D 代謝酵素 (1α OHase、24OHase) と小腸におけるリン酸輸送担体 (NaPi-IIb) の mRNA 量の変化をノーザンブロッティングで検出した写真である。

図 10 は、腫瘍移植後 44 日目～46 日目に屠殺したマウスより採取した大腿骨の X 線写真である。

図 11A は、PBS、CHO ras clone-1 細胞および CHO-OST311H 細胞をヌードマウス(6 週齢、BALB/c、雄)へ移植後、2 日目における血清リン酸、カルシウム濃度を比較した図である。

それぞれの値は、平均±標準偏差で表されている。

図 11B は、PBS、CHO ras clone-1 細胞および CHO-OST311H 細胞をヌードマウス(6 週齢、BALB/c、雄)へ移植後、6 日目における血清リン酸、カルシウム濃度を比較した図である。

それぞれの値は、平均±標準偏差で表されている。

図 12 は、CHO-OST311H 細胞の培養上清を精製し、溶出画分を抗 His6 抗体および抗 OST311 ペプチド抗体(311-114)を用いてウェスタンブロッティングした結果を示す写真である。左パネルは 311:26-251、中央パネルは 311:25-179、右パネルは 311:180-251 をそれぞれ検出した図である。ゲル写真上部に「*」で記し

た画分を、正常マウスへの単回投与試験に用いた。

図 13 は、CHO-OST311H 細胞移植マウスおよび腫瘍なしマウスより摘出した脛骨骨幹端部の、非脱灰切片を Villanueva goldner 染色した写真である。

図 14 は、CHO-OST311H 細胞移植マウスおよび対照マウスより摘出した腎臓における、ビタミン D 代謝酵素遺伝子産物のノザンブロッティングを示した写真である。

図 15 は、A は、CHO 産生型組換え OST311H 全長蛋白質の正常マウスへの投与試験 1 について、タイムスケジュールを表した図である。B は、各採血時における血清中リン酸濃度を、C は、同時点での血清カルシウム濃度を表したグラフである。

図 16 は、A は、CHO 産生型組換え OST311H 全長蛋白質の正常マウスへの投与試験 2 について、タイムスケジュールを表した図である。B は、各採血時における血清中リン酸濃度を、C は、同時点での血清カルシウム濃度を表したグラフである。

図 17 は、変異型組換え体 OST311RQH を産生する CHO-OST311RQH 細胞および OST311RQH/pEAK rapid 細胞の培養上清をウェスタンブロッティングに供し、上清中組換え体を検出した写真である。

図 18 は、A は、変異型組換え体 OST311RQH の正常マウスへの投与試験について、タイムスケジュールを表した図である。B は、各採血時における血清中リン酸濃度を、C は、同時点での血清カルシウム濃度を表したグラフである。

図 19 は、A は、CHO-OST311RQH 細胞移植試験の移植後 2 日目における血清リン酸濃度を示した図である。B は、同試験における血清カルシウム濃度を示した図である。

図 20 は、CHO-OST311H 細胞の無血清培養上清中の組換え OST311H を抗 OST311 部分ペプチドウサギ抗血清を用いてウェスタンブロッティングにより検出した写真である。

図 21 は、A は、6 種類の抗 OST311 ペプチドポリクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA を構築し、個々の組み合わせに対する組換え OST311 の検出レベルを示した表である。B は、固相化抗体として 311-48 抗体または 311-180 抗体を、

検出用抗体として 311-148 抗体を組み合わせた ELISA システムを用いて、精製組換え OST311H の濃度とそれぞれに対する測定値の関係をプロットしたグラフである。

図 22 は、A は、組換え OST311 蛋白質または媒体をマウスに投与後 1、3、8 時間目における腎臓 NaPi-7 の発現をウェスタンブロッティングで確認した図である。B は、同様の処置をした腎臓のトータル RNA を用い、NaPi-7 の発現をノザンブロッティングで確認した図である。

図 23 は、組換え OST311 蛋白質または媒体をマウスに投与後 1、3、8 時間目における血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度の推移を表した図である。

図 24 は、組換え OST311 蛋白質または媒体をマウスに投与後 1、3、8 時間目における腎臓のトータル RNA を用いて、25-ヒドロキシビタミン D-1- α -水酸化酵素(1 α OHase)あるいは、25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素(24OHase)遺伝子の発現をノザンブロッティングで確認した図である。

図 25 は、細胞移植後 3 日目での、CHO-ras clone-1 細胞移植群における平均血清リン酸濃度値を 100%とした場合の、各群における平均血清リン酸レベルを表した図である。

図 26 は、プラスミド OST311/pET28 にコードされる組換え体 His-OST311 の DNA 塩基配列とアミノ酸配列ならびにプラスミド pET22-MK-OST311 にコードされる組換え体 MK-OST311 の DNA 塩基配列とアミノ酸配列を示した図である。

図 27 は、リフォールディング後の組換え体 His-OST311 を陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社)を用いて HPLC 精製した際の溶出パターンを示した図である。

図 28 は、リフォールディング後の組換え体 MK-OST311 を陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社)を用いて HPLC 精製した際の溶出パターンを示した図である。

図 29 は、PEG 化した組換え体 MK-OST311 を陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社)を用いて HPLC 精製した際の溶出パターンを示した図である。

図 30 は、大腸菌産生型 His-OST311 組換え体(A)または PEG 化 MK-OST311 組換え体(B)を単回投与してから 8 または 9 時間後における血清リン酸濃度を表し

た図である。

図 31 は、大腸菌産生型 His-OST311 組換え体を単回投与してから 1 および 4 時間後での腎臓におけるビタミン D 代謝酵素遺伝子の発現変化をノザンブロットィング法で解析した結果を表す図である。

図 32 は、大腸菌産生型 His-OST311 組換え体を単回投与してから 1、4 および 9 時間後での血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の濃度変化を表す図である。

図 33 は、本図は OST311 のアミノ酸 174~180 番目に変異を導入し、その遺伝子を pEAK 細胞で発現させたときの細胞上清に分泌される変異 OST311 組換え体をウェスタンブロットィングにて検出した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例 1 ヒト腫瘍性骨軟化症由来腫瘍 cDNA ライブラリーの作製

液体窒素で凍結させた腫瘍組織を 5 ml の ISOGEN(日本国 ニッポンジーン)液中で破碎、懸濁させた後、添付文書に従って約 0.13 mg のトータル RNA を調製した。このトータル RNA 1.5 μ l より、SMART cDNA ライブラリー作製キット(米国 CLONTECH 社)を用いて、添付文書に従い cDNA を合成した。以下、本 cDNA を cDNA#2 と表記する。この cDNA#2 に *Eco*RI アダプターを付加し、あらかじめ制限酵素 *Eco*RI で消化した λ ZAPII フェージベクター(米国 STRATAGENE 社)に組み込み込んだ後、Gigapack III Gold フェージパッケージングキット(米国 STRATAGENE 社)を用い、添付文書に従い、腫瘍性骨軟化症腫瘍フェージライブラリーを作製した。得られたライブラリーは、独立なクローンを合計で約 60 万種類を含んでいた。さらに、上記フェージライブラリーを大腸菌 XLI-Blue MRF' 株に感染させた後、15 cm のシャーレ 20 枚に蒔き直し、37℃で 10 時間保温することで、プラークを形成させた。このプラークをすべて SM バッファーに抽出し、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA フェージライブラリーとした。

実施例 2 腫瘍 cDNA のポジティブスクリーニングの実施

概要

腫瘍性骨軟化症の原因遺伝子は、腫瘍の外科的除去において治癒し得ることから、腫瘍において特異的に高発現している可能性が示唆されている。また、これまでの報告では、腫瘍性骨軟化症の腫瘍は中杯葉系、とりわけ間充織細胞由来であることが多い。したがって、正常な中杯葉由来組織中には発現が低く、腫瘍組織中のみ特異的に高発現している遺伝子群を同定することが必要と考えられる。そこで、以下に示すとおり、cDNA サブトラクション法を応用したポジティブスクリーニングを実施した。腫瘍組織由来 cDNA と、対照として骨組織より単離した cDNA とをサブトラクションすることで、腫瘍組織中のみ特異的に高発現し、骨組織中には発現していない遺伝子群を濃縮した。このサブトラクションした cDNA 群をプローブに用い、腫瘍 cDNA ファージライブラリーをハイブリダイゼーションすることで、腫瘍特異的発現遺伝子断片を得た。

(1) 対照ヒト骨組織 cDNA の作製

液体窒素で凍結させたヒト骨組織を 5 ml の ISOGEN(日本国 ニッポンジーン)液中で破碎、懸濁させた後、添付文書に従って約 0.011 mg のトータル RNA を調整した。このトータル RNA 3 μ l より、SMART cDNA ライブラリー作製キット(米国 CLONTECH 社)を用いて、添付文書に従い cDNA を合成した。このようにして得られた cDNA を、以下、cDNA#4 と表記する。

(2) 腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA と対照骨組織 cDNA のサブトラクション

実施例 1 で記載した cDNA#2 に高発現している遺伝子を濃縮するため、PCR-Select cDNA サブトラクションキット(米国 CLONTECH 社)を用い添付文書に従って、実施例 2(1)で記載した cDNA#4 とハイブリダイゼーションさせることにより、cDNA#2 から cDNA#4 に含まれている遺伝子断片を差し引いた(サブトラクションした)。その後、差し引かれた cDNA#2 は添付文書に従い PCR 増幅され、サブトラクション済み cDNA 群(A)を得た。

一方、サブトラクションキットの性質上、ハイブリダイゼーションの過程が 2 回

であり、定法に比べ少ないため、両者に共に多く存在する遺伝子は完全にサブトラクションされにくい。そのため、サブトラクション済み cDNA 群(A)のみをプローブとして、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーとハイブリダイゼーションした場合、完全にサブトラクションできていない遺伝子もポジティブクローンとして得られてしまう。そこで、対照プローブとして実施例 2(1)で記載した cDNA#4 から cDNA#2 を同様の手法で差し引いた後、PCR 増幅したサブトラクション済み cDNA 群(B)を調製した。このサブトラクション済み cDNA 群(B)と、先に述べたサブトラクション済み cDNA 群(A)とをそれぞれ腫瘍 cDNA ライブラリーに対してハイブリダイゼーションし、両者のシグナルを比較することで、腫瘍性骨軟化症腫瘍に特異的に含まれる遺伝子断片を単離する事が可能となる。

(3) 腫瘍 cDNA ライブラリーのディファレンシャルハイブリダイゼーション

実施例 1 に記載した腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA フェージライブラリーを大腸菌 XLI-Blue 株に感染後、15 cm シャーレー一枚あたり 3,000 プラークを形成するように蒔き直し、37℃で 8 時間保温した。その後、Hybond N+ (米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)ナイロンフィルターに各 2 枚ずつプラークを写し取った。転写したナイロンフィルターを添付文書に従って DNA の固定処理を行い、実施例 2(2)で記載したサブトラクション済み cDNA(A)およびサブトラクション済み cDNA(B)をそれぞれプローブとしてスクリーニングを実施した。

プローブ標識、ハイブリダイゼーション及びシグナル検出は、Alphos Direct システム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用い、添付文書に従い実施した。プローブには、実施例 2(2)で記載したサブトラクション済み cDNA(A)およびサブトラクション済み cDNA(B)をそれぞれ 100 ng ずつ用い、プロトコールに従い蛍光標識した。本プローブを Alphos Direct システム付属のハイブリダイゼーションバッファー 50 ml にそれぞれ加え、同時に 8 枚のプラークを転写したナイロンフィルター 2 組をそれぞれプロトコールに従いハイブリダイズ、洗浄した。洗浄後、ナイロンフィルターを発光反応に供し、ECL フィルム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)に 2 時間露光し、自動現像機(日本国 フジフィルム)にて現像し、結果を解析した。

その結果、サブトラクション済み cDNA(A)をプローブに用いた場合に強く露光し、サブトラクション済み cDNA(B)をプローブに用いた場合に露光しない部分に位置する単一のブランクを目視で選択し、シャーレから掻き取り 0.5 ml の SM バッファーに懸濁後、4℃に 2 時間以上静置することにより、ファージを抽出した。

(4) ポジティブクローンの塩基配列解析

実施例 2(3)で得られたポジティブクローンを含んだファージ溶液 0.5 μ l を鋳型とし、ファージベクター内部配列である T7 プライマー (TAATACGACTCACTATAGGG) (配列番号 24) および T3 プライマー (ATTAACCCCTCACTAAAGGGA) (配列番号 25)、LA-taq ポリメラーゼ(日本国宝酒造社)を用い、96℃ で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒からなる工程を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR を実施した。PCR 産物を 0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、明瞭な単一のバンドが認められたクローンについて、PCR 増幅断片を鋳型に用いて ABI377 DNA シーケンサー(米国 PE アプライドシステムズ社)を用いて配列決定した。

一方、明瞭な 2 本のバンドが認められた場合、相当するバンドのゲル部分より、それぞれ QIAquick Gel Extraction kit(独国 QIAGEN 社)を用いて PCR 産物を抽出し、ABI377 DNA シーケンサーにより配列決定した。

腫瘍性骨軟化症ファージライブラリー 34 万 1 千個のブランクについてディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った結果、456 個のポジティブブランクを確認し、これらすべてを塩基配列決定した。

実施例 3 ヒト低リン誘導因子候補遺伝子の絞り込み

実施例 2 において得られたポジティブクローン 456 個の配列情報について、NCBI が提供する塩基配列データベースである Genbank に登録されている塩基配列に対して相同性検索した。その結果、出現頻度の高い既知遺伝子として表 1 に記載した遺伝子群が得られた。一方、データベース検索の結果、生物活性の不明な未知遺伝子断片が 100 クローン存在した。これら未知遺伝子断片の塩基配列情報について、クローン間での重複を頻度情報として抽出した。その中で最も高頻度

に重複した遺伝子として、7クローンが連続して1つのコンティグを形成した配列 OST311 が得られた。このとき得られた塩基配列情報は、配列番号1の塩基番号 1522 から 2770 であった。本遺伝子断片を既存データベースにて検索したところ、cDNA 又は EST として登録されてはならず、ゲノム配列にのみ一致した。該当するゲノム配列は AC008012 であり、染色体上の 12p13 に位置することがすでに報告されている。しかしながら、得られた配列内には蛋白質をコードする領域(ORF)は認められず、3' 側非翻訳領域であると予想されたため、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーより cDNA の全長クローニングを実施した。なお、ORF の予測には、DNASIS-Mac version 3.7 の ORF 予測機能を用いた。

表 1

クローン ID	頻度	記 載
OST 131	236	デンチン (dentin) マトリックスタンパク質 -1 (DMP1)
OST 1	35	熱ショックタンパク質-90 (HSP90)
OST 2	13	オステオポンチン (osteopontin)
OST 311	7	不明/ ゲノム DNA 12p13
OST 1001	4	CD44 抗原
OST 584	3	フィブロネクチン
OST 666	3	翻訳調節腫瘍タンパク質
OST 133	2	ベータ 2 ミクログロブリン
OST 837	2	繊維芽細胞増殖因子 (FGF)
OST 562	2	アンネキシン II/リポコルチン II
OST 1002	2	チトクロム c オキシゲナーゼ サブユニット 2
OST 1003	2	スタスミン (stathmin)
OST 1004	2	不明
OST 903	2	不明

実施例 4 OST311 の全長クローニング

実施例 3 で得られた OST311 の配列に基づいて、以下のプライマーを合成し、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーのファージ溶液を鋳型として、96℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 30 秒からなる工程を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR を実施した。

311-U65 : TTCTGTCTCGCTGTCTCCC (配列番号 12)

311-L344: CCCCTTCCCAGTCACATTT (配列番号 13)

PCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、予想されるサイズのPCR産物の増幅を確認した後、MicroSpin カラム S-300HR(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用いてPCR産物を精製した。得られたPCR産物をAlphos Direct システム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用い添付文書に従って蛍光標識し、これをプローブとして、2万クローンの腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーのブラークハイブリダイゼーションを実施した。

得られた40個のポジティブクローンを、T7およびT3を用いて、実施例2(4)に記載した要領でPCR増幅し、得られたPCR産物の塩基配列を基に、プライマー311-L296(配列番号14, GGGGCATCTAACATAAATGC)を合成した。再度、311-U65(配列番号12)と311-L344(配列番号13)プライマーで増幅されるPCR産物をプローブとして、2万クローンの腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーのブラークハイブリダイゼーションを実施した。ポジティブクローン62個について、T7と311-L296(配列番号14)プライマーで増幅したPCR産物の塩基配列を決定し、これまで判明した塩基配列と連結した。その結果、配列番号1に示す塩基配列が得られた。この配列番号1の塩基番号133に位置する開始コドンからOST311のORFが始まることが判明した。さらにORFの配列を最終的に確定するため、以下のプライマーを合成した。

311-F1 : AGCCACTCAGAGCAGGGCAC (配列番号15, 塩基番号112-131)

311-F2 : GGTGGCGGCCGTCTAGAACTA (配列番号16, ベクター配列)

311-F3 : TCAGTCTGGGCGGGCGAAGA (配列番号17, 塩基番号539-559)

311-L1 : CACGTTCAAGGGGTCCCGCT (配列番号18, 塩基番号689-708)

311-L3 : TCTGAAATCCATGCAGAGGT (配列番号19, 塩基番号410-429)

311-L5 : GGGAGGCATTGGGATAGGCTC (配列番号20, 塩基番号200-220)

311-L6 : CTAGATGAACTTGGCGAAGGG (配列番号21, 塩基番号868-888)

上記311-F2(配列番号16)および311-L6(配列番号21)プライマーを用い、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーを鋳型として、Pyrobest DNA polymerase(日本国 宝酒造社)を用いて、96℃、30秒、55℃、30秒、72℃、30秒からなる工程を1サイクルとした35サイクルのPCRを実施した。

このPCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動したところ、約980塩基対か

らなる単一の増幅断片が認められた。そこで、本増幅断片を、上記プライマー(配列番号 15 から 21)を用いて塩基配列決定した結果、配列番号 1 の塩基番号 133 に位置する開始コドン ATG、および塩基番号 886 に位置する終止コドン TAG に挟まれた、配列番号 2 に示すポリペプチドをコードする ORF 領域を確定した(配列番号 1)。

実施例 5 OST311 の腫瘍性骨軟化症腫瘍特異性

OST311 の腫瘍特異性を検討するため、腫瘍組織より抽出した first-strand cDNA および対照骨組織より抽出した first-strand cDNA を鋳型に、下記に示す OST311 特異的プライマー(配列番号 22 及び 23)を用い、96℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒からなる工程を 1 サイクルとした 35 サイクルの PCR を実施した。なお、両反応液中には終濃度 2%となるよう DMSO を添加し、酵素には LA-taq DNA polymerase(日本国 宝酒造社)を用いた。また、内部標準として G3PDH に特異的なプライマー(FW:ACCACAGTCCATGCCATCAC (配列番号 26)、RV:TCCACCACCCTGTTGCTGTA (配列番号 27))による PCR も同様な条件で実施した。

311F1EcoRI: CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCACG (配列番号 22)

311LHisNot:ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATGA
ACTTGGCGAA (配列番号 23)

図 1 に示したように、これらの PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動したところ、OST311 プライマーを用いた場合、腫瘍組織を鋳型にした場合のみ予想されるサイズの PCR 産物が認められた。一方、G3PDH プライマーを用いた場合では、腫瘍組織、対照骨組織共に予想されるサイズの PCR 産物が同程度に認められた。この結果から、OST311 が腫瘍組織特異的に発現していることが確認された。

実施例 6 OST311 安定発現 CHO 細胞の取得

(1)OST311 発現ベクターの構築

実施例 5 で示した 311F1EcoRI (配列番号 22)および 311LHisNot(配列番号 23)プライマーを用い、腫瘍性骨軟化症腫瘍 cDNA ライブラリーを鋳型に、96℃で 30

秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒からなる工程を 1 サイクルとした 35 サイクルの PCR を実施した。なお、応液中には終濃度 2%となるよう DMSO を添加し、酵素には LA-taq DNA polymerase(日本国 宝酒造社)を用いた。311F1EcoRI プライマーは、Kozak 配列より上流に位置する、配列番号 1 の塩基番号 111 よりアニーリングし、311LHisNot プライマーは配列番号 1 の塩基番号 871 よりアニーリングし、両プライマーを用いた PCR を行うことで、配列番号 2 に示した全長ポリペプチドをコードする領域を増幅できる。また、311LHisNot プライマー中には、配列番号 2 のアミノ酸番号 251 番目に続きヒスチジン残基を 6 個付加した後、終止コドンとなるような塩基配列が含まれている。そのため、翻訳された組換え蛋白質は C 末端に His6 タグ配列を有しており、抗体による組換え体の認識やニッケルレジンによる組換え体精製に有用できる。

PCR 増幅断片を制限酵素 *EcoRI* および *NotI* で消化した後、同様に *EcoRI*、*NotI* で消化した動物細胞発現用プラスミドベクター pcDNA3.1Zeo(米国 INVITROGEN 社)と連結した。得られた組換えベクターを大腸菌 DH5 α 株に遺伝子導入し、100 mg/ml アンピシリンを含む LB 培地 3 ml で培養後、GFX プラスミド精製キット(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用いてプラスミドの精製を行った。挿入遺伝子の配列を常法に従って決定し、配列番号 1 の相当部分と一致し、かつ終止コドン直前に His6 タグ配列をコードする塩基配列が付加されていることを確認した。

(2)OST311 安定発現 CHO 細胞の取得

実施例 6(1)で作製した OST311ORF 部分を挿入したプラスミド約 20 μ g を、ベクター内にあるアンピシリン耐性遺伝子を 1 か所で切断する制限酵素 *FspI* で消化した後、エタノール沈殿させ、10 μ l の超純水に溶解した。その後、Gene Pulser II(米国 Bio Rad 社)を用いて電気穿孔法(エレクトロポレーション)により全量を宿主細胞に導入した。宿主細胞には CHO Ras clone-1 細胞(Shirahata, S., Biosci. Biotech. Biochem, 59(2):345-347, 1995)を用いた。75cm²培養フラスコ(米国 コーニング社)で 37℃、5 % CO₂、湿度 100 % 下、10 % FCS 入り MEM α 培地で培養面積の約 90%を占めるまで CHO Ras clone-1 を培養した。その後、接着細胞

をトリプシン処理することで剥離させ、約 1×10^7 個の細胞を得た。得られた細胞を 0.8 ml の PBS に懸濁した後、FspI 消化したプラスミドと混合し、10 分間氷冷した。プラスミドを含んだ細胞を 0.4 cm 間隔の専用キュベットに移し、電気パルスを 0.25 kV、975 μ F の設定値でかけた後、キュベットを再度 10 分間冷却した。遺伝子導入された細胞を 10 % FCS 入り MEM α 培地で 24 時間培養した後、終濃度 0.5 mg/ml となるようゼオシン(米国 INVITROGEN 社)を加え、さらに 1 週間培養した。その後、薬剤耐性を示した細胞をクローン化するため、限界希釈法により 0.2 細胞 / ウェルとなるように 96 ウェルプレート(米国 コーニング社)に播種し直し、終濃度 0.3 mg/ml ゼオシン存在下、約 3 週間培養することで、薬剤耐性株 35 クローンを得た。

(3) OST311 安定発現 CHO 細胞の組換え体産生の確認

薬剤耐性を示した 35 クローンについて、その培養上清中の組換え体 OST311 の存在をウエスタンブロッティング法で確認した。

回収した培養上清 0.2 ml をウルトラフリー MC M.W.5,000 カットメンブレンシステム(米国 MILLIPORE 社)を用いて約 40~50 μ l に濃縮し、1 M Tris-Cl pH6.8、5 % SDS、50 % グリセロール、100 mM DTT を含むサンプルバッファーを 10 μ l 添加し、95℃、5 分間加熱した。そして、10-20% 勾配のポリアクリルアミド電気泳動にて培養上清中の蛋白質を分離した。その後、セミドライブロッティング装置(米国 Owl Separation Systems 社)を用い、ゲル中の蛋白質を Immobilon PVDF 膜(米国 MILLIPORE 社)に転写した。この PVDF 膜を、TTBS バッファー(米国 Sigma 社)中で 1/5000 希釈した抗 His(C 末)抗体(米国 INVITROGEN 社)とともに室温で 1 時間インキュベーションした後、ECL 発光システム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用いてフィルムに 5 分露光し、自動現像機(日本国フジフィルム社)で現像した。その結果、約 32 kDa および約 10 kDa に最も強いシグナルを認めたクローン#20 を単離した。以下、#20 細胞を、CHO-OST311H と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所、特許微生物寄託センター(茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1) に寄託した(受託番号 FERM BP-7273)。

実施例 7 CHO-OST311H 培養上清によるリン輸送阻害活性の測定

CHO-OST311H を 225 cm² 培養フラスコ(米国 コーニング社)で 37℃、5 % CO₂、湿度 100 % 下、10 % FCS 入り MEM α 培地でフラスコ面積の約 80% を占めるまで増殖させた後、培地を無血清培地 CHO-S-SFM II(米国 LIFE TECHNOLOGY 社)30 ml に置き換え、48 時間後に上清を回収した。浮遊細胞等を除くため上清を 1,200 g で 5 分間遠心した後、Minisart-plus 0.22 μ m フィルター (独国 Sartorius 社)を用いて濾過した。

この培養上清を用いて、ヒト腎臓近位尿細管細胞株 (CL-8 細胞) のリン酸輸送活性に対する作用を検討した。ヒト腎臓近位尿細管細胞株は、10% の FCS を含む DMEM 培地 (LIFE TECHNOLOGY 社) を用いて 5 % CO₂、湿度 100 % 下 37℃ にて培養した。リン輸送活性の測定には、まず 48-ウェルプレート(米国 コーニング社)にヒト腎臓近位尿細管細胞株を 10% の FCS を含む DMEM 培地で培養した。培養開始から 3 日目に細胞がプレート底面の全体を覆うようにまで増殖したところで培養液を 200 μ l の無血清培地 CHO-S-SFM II(米国 LIFE TECHNOLOGY 社)に置き換え、さらに 20~24 時間培養した。この状態の細胞を用いて以下のリン酸輸送活性測定実験 (実験 1 と実験 2) を実施した。

(1) 実験 1 :

CHO-S-SFM II 培地を除去して、上述の CHO-S-SFM II 培地で調製した CHO-OST311H 細胞の培養上清をウェルあたり 200 μ l 添加した。このとき対照として、CHO-S-SFM II を置換しないウェル、および、CHO-OST311H と同様に調製した CHO-OST190H 細胞の培養上清を 200 μ l 添加したウェルを、それぞれ 3 ウェルずつ作製した。上述の CHO-OST190H 細胞は、CHO-OST311H 細胞と同様の方法で本発明者がクローン化した OST190H を発現できる形で CHO ras clone-1 に導入して作製した組み換え体細胞である。CHO-OST190H は、Rowe, P.S.N. et al, Genomics 67:54-68, 2000 で報告されている、MEPE と名付けられたポリペプチドと同じポリペプチドの C 末端に、OST311H と同様に His6 タグ配列を付与したものを発現する。このサンプル添加後、さらに 26 時間 CO₂ インキュベーター内でインキュベートしたのち、次に示すリン酸輸送活性測定法により、各ウェルの細胞のリン酸輸送活性を測定した。

(2)実験 2 :

200 μ l の CHO-S-SFM II のうち 100 μ l を除去した。これに CHO ras clone-1 細胞の培養上清 100 μ l を添加したウェル、および、CHO-OST311H 細胞培養上清を 100 μ l 添加したウェルを、それぞれ 3 ウェルずつ作製して 24 時間 CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。その後、以下のリン酸輸送測定法により、各ウェルの細胞のリン酸輸送活性を測定した。

リン酸輸送活性測定法 :

培養上清を添加してインキュベーションが終了した細胞をリン酸を含まない緩衝液 (150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1.8 mM MgSO₄, 10 mM HEPES pH7.4) で洗浄したのち、同溶液で 10 分間室温でインキュベートする。この液を除去し、この緩衝液に放射活性を含む KH₂PO₄ (NEN 社) を 0.105 mM となるように加えたアッセイ溶液を添加して、室温で 10 分間インキュベートする。インキュベート終了後、アッセイ溶液を除去して直ちに氷冷しておいた停止溶液 (150 mM 塩化コリン, 1 mM CaCl₂, 1.8 mM MgSO₄, 10 mM HEPES pH7.4) で細胞を 3 回洗浄する。この洗浄液を除去したのち、0.2N NaOH を 80 μ l 添加して室温で 10 分間インキュベートし、細胞を溶解させた。この細胞溶解液中の放射活性を測定するために、この溶解液を ReadyCap (Beckman 社) に移して 50℃ で乾燥させた後、ガラスバイアルに入れてシンチレーションカウンター (Wallac1410、Pharmacia 社) で測定した。各アッセイにおけるリン酸輸送活性は、培養上清を添加しなかった対照における取り込みの平均値を 100% として表 2 に示した。CHO-OST311H 細胞の培養上清は、有意にヒト腎臓近位尿細管上皮細胞のリン酸輸送活性を抑制した。

表 2. 腎臓尿細管上皮細胞のリン酸輸送に対する OST311 の活性

実験 1

サンプル	リン酸輸送活性 \pm SEM	t-test
上清非添加	100 \pm 1.9	—
CHO-OST190H	103.8 \pm 0.9	有意差なし
CHO-OST311H	87.4 \pm 0.2	p<0.01
実験 2	リン酸輸送活性 \pm SEM	t-test
CHO 上清添加	100 \pm 1.5	—
CHO-OST311H	87.2 \pm 1.2	p<0.01

実施例 8 CHO-OST311H 培養上清からの組換え OST311 の部分精製

実施例 7 に記載した要領で調製した培養上清を、以下に示す方法で部分精製した。なお、工程 1) から 4) は 4℃ クロマトチャンバー内で実施した。

1) ProBond ニッケルレジン(米国 INVITROGEN 社)をベッドボリュームが 3 ml となるよう使い捨てポリプロピレンカラムに詰め、30 ml のバッファー 1(表 3) で洗浄、平衡化した。

2) 実施例 7 に記載した要領で調製した培養上清 120 ml を上記ニッケルカラムに自由落下により供し、組換え OST311 を結合させた。

3) 表 3 に示すバッファー 2 を 30 ml 用い、非特異的に吸着しているタンパク質を除去した。

4) 表 3 に示すバッファー 3 を 3 ml ずつ 4 回にわけて添加し、組換え OST311 を溶出した。4 つの画分を 20 μ l ずつ、それぞれ原液のまま実施例 6(3)に記載した要領でウエスタンブロッティングに供し、抗 His 抗体で OST311 の検出を試みた。

その結果、第 2 画分に集中して約 32 kDa および約 10 kDa のシグナルが認められた。

5) 上記第 2 画分を NAP25 および NAP10 カラム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)に供し、溶媒を表 3 に示すバッファー 4 に置換した。

6) バッファー4に置換した組換え OST311 を、高速液体クロマトグラフィー(日本国 日立製作所)を用い、強陽イオン交換樹脂である SP-5PW(日本国 トーソー社)に 1 ml/分の流速で供し、表 3 に示すバッファー5を 1%/分の勾配で加えることにより溶出し、2 ml ずつ分取した。図 2 に示すように、それぞれの溶出画分について、実施例 8(5)の要領でウェスタンブロッティングを実施し OST311 の検出を試みたところ、約 280 mM NaCl で約 10 kDa のシグナルが分離され、約 400 mM NaCl で約 32 kDa のシグナルが分離されたことを確認した。対応する画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、銀染色キット(日本国 第一化学社)を用いて染色したところ、約 10 kDa および約 32 kDa を含む画分の純度は 70 %以上であった。

表 3

バッファー1	バッファー2	バッファー3	バッファー4	バッファー5
10 mM Na/Pi pH6.5 0.5 M NaCl	10 mM Na/Pi pH6.5 10 mM imidazole 0.5 M NaCl	10 mM Na/Pi pH6.5 0.5 M imidazole 0.5 M NaCl 5 mM CHAPS	10 mM Na/Pi pH6.5 5 mM CHAPS	10 mM Na/Pi pH6.5 1 M NaCl 5mM CHAPS

Na/Pi : リン酸ナトリウム緩衝液

実施例 9 部分精製した組換え OST311 の N 末端アミノ酸配列解析

実施例 8 に記載した方法で得られた、抗 His 抗体で認識される約 10 kDa および約 32 kDa の部分精製画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、セミドライブロッティング装置(米国 Owl Separation Systems 社)を用い、ゲル中の蛋白質を Immobilon PVDF 膜(米国 MILLIPORE 社)に転写した。この PVDF 膜を CBB 染色することで約 10 kDa および約 32 kDa のバンドを切り出し、プロテインシーケンサ Model492(米国 PE アプライドシステムズ社)を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。

その結果、約 35 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列は、配列番号 2 の残基番号 25 番目の Tyr から始まる OST311 の配列であることが判明し、このことから配列番号 2 の残基番号 1 番目の Met から 24 番目の Ala までは分泌シグナル配列とし

て切断されていることが確認された。一方、約 10 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列は、配列番号 2 の残基番号 180 番目 Ser から始まる OST311 の配列であることが判明した。この 180 番目 Ser の直前に RRXXR からなるモチーフが存在していることから、組換え OST311 は CHO 細胞由来の何らかのプロテアーゼにより切断を受けていることが判明した。

以上のことから、CHO-OST311H 細胞が産生する組換え OST311 は、分泌後、配列番号 2 において、残基番号 25 番目 Tyr から 251 番目 Ile までのポリペプチド(配列番号 4)、残基番号 25 番目 Tyr から 179 番目 Arg までのポリペプチド(配列番号 6)、残基番号 180 番目 Ser から 251 番目 Ile までのポリペプチド(配列番号 8)の少なくとも 3 種類のポリペプチドとして存在していることが判明した。

実施例 10 抗 OST311 部分ペプチドポリクローナル抗体の作製

配列番号 2 のポリペプチドを MacVector version 6.5.1 の計算機能を用いて、疎水性度を予測し、ペプチド抗体作製に適した部位を予測した(図 3A および B)。親水性の程度が高く、かつ糖鎖修飾やリン酸化部位となりうる部位以外という観点から、配列番号 2 の残基番号 48 番目 Arg から始まる 20 アミノ酸からなるペプチドに C 末端に合成段階でシステイン残基を人工的に付加した 311-48(配列番号 28)および、残基番号 114 番目 Arg から始まる 20 アミノ酸からなるペプチドに同様にシステイン残基を付加した 311-114(配列番号 29)を抗原として選択、合成した。なお、両ペプチドの C 末端に合成段階でシステイン残基を人工的に付加し、キャリア蛋白質(ウシサイログロブリン)との結合に用いた。キャリア蛋白質との結合およびウサギへの免疫は、免疫生物研究所(群馬県藤岡市 1091 番地 1 号)に委託した(受託番号:1515)。

311-48: RNSYHLQIHKNGHVDGAPHQC (配列番号 28)

311-114: RFQHQTLENGYDVYHSPQYHC (配列番号 29)

実施例 11 CHO-OST311H 細胞のヌードマウスへの移植試験

OST311 が腫瘍性骨軟化症の惹起因子であるかを検証するため、6 週齢 BALB/c ヌードマウス(雄)に CHO-OST311H 細胞を移植し、腫瘍を形成させることに

より、恒常的に腫瘍から組換え OST311 を分泌するマウス腫瘍性骨軟化症モデルを構築した。実験対照として CHO ras clone-1 細胞と実施例 7 に記載した CHO-OST190H も同様に移植実験に用いた。

(1)CHO 細胞移植

CHO-OST311H 細胞と CHO-OST190 細胞を培養フラスコからトリプシン処理により分散させ、 1×10^8 個/ml となるよう PBS に懸濁し、これをヌードマウスの両脇腹に 0.1 ml ずつ皮下注射した(2×10^7 個/匹)。また、対照群として、同数個の CHO ras clone-1 細胞を同様の方法で皮下注射した。その後、約 1 か月間、固形食 CE-2(日本国 日本クレア社)および水道水を自由摂取させ、5 匹ずつプラスチックケージで飼育した。移植して 2 週間経過した時点での腫瘍形成の認められる割合は、対照群が 75%、OST311 群が 66.7%であった。

(2)体重変化の比較

CHO-OST311H 細胞を移植してから 31 日間の、非腫瘍形成群 (avr.-で表示されたグラフ) および CHO-OST311H 細胞腫瘍形成群 (avr.+で表示されたグラフ) の平均体重の経時変化を比較した。図 4 に示すように、CHO-OST311H 細胞腫瘍形成群は非腫瘍形成群に比し、体重増加抑制を示し、両群間には明らかに有意差が認められた(24.1 ± 1.5 g vs. 26.7 ± 1.0 g, $p < 0.001$, day31)。一方、対照 CHO ras clone-1 細胞腫瘍形成群と非腫瘍形成群との平均体重において、同様な差は認められなかった(27.0 ± 1.8 g vs. 26.7 ± 1.0 g, 有意差無し, day31)。

(3)血清リン、カルシウムおよび尿中リン、カルシウムの測定

細胞移植して 30 から 40 日後、代謝ケージで 24 時間飼育し尿を回収後、エーテル麻酔下、心採血または眼窩採血を実施した。末梢血は、マイクロテイナ(米国 ベクトンディッキンソン社)により血清分離した。尿は容量測定後、遠心分離により上清を回収した。血清、尿中リン濃度の測定はリン-テストワコー(日本国 和光純薬社)を、血清、尿中カルシウム濃度の測定はカルシウム-テストワコー(日本国 和光純薬社)を、血清、尿中クレアチニン濃度の測定は CRE-EN カイノス(日本国 カイノス)をそれぞれ用いて実施した。

実験 1 :

細胞移植後 34 日目における、非腫瘍形成群、CHO ras clone-1 細胞腫瘍形成群、CHO-OST190H 細胞腫瘍形成群、CHO-OST311H 細胞腫瘍形成群の血清リン酸濃度を測定した。

実験 2 :

細胞移植後 44 日～46 日目の腫瘍非形成群と CHO-OST311H 細胞腫瘍形成群での血清および尿中のリン酸濃度、カルシウム濃度、クレアチニン濃度を測定した。腎臓のリン酸およびカルシウム分画排泄は、リン酸又はカルシウムのクリアランスをクレアチニンクリアランスで除して求めた。

測定結果を以下の表 4 に示す。

表 4. 細胞移植マウスにおける血清および尿中のリン酸およびカルシウム動向

実験 1

群	個体数	血清リン酸濃度±SEM (mg/dl)	t-test
腫瘍なしマウス	7	8.17±0.60	—
CHO ras clone-1	4	8.50±0.38	有意差なし
CHO-OST190H	4	9.49±0.52	有意差なし
CHO-OST311H	9	4.39±0.23	p<0.001

実験 2

群	腫瘍なし	CHO-OST311H	t-test
個体数	4	6	—
血清リン酸濃度±SEM (mg/dl)	8.29±0.59	4.25±0.15	p<0.001
腎臓でのリン酸分画排泄	0.23±0.02	0.44±0.06	p<0.05
血清 Ca 濃度±SEM (mg/dl)	6.72±0.27	4.61±0.19	p<0.001
腎臓でのカルシウム分画排泄	0.0040±0.0006	0.0059±0.0010	有意差なし

(4)全身骨格の X 線撮影

CHO-OST311H 細胞移植後、腫瘍形成の認められる個体は、非腫瘍形成個体あるいは対照 CHO ras clone-1 移植個体と比し、顕著な体格異常と歩行機能異常を呈したことから、骨格異常が予想された。そこで、対照 CHO ras clone-1 細胞移植群、CHO-OST190H 細胞移植群、CHO-OST311H 細胞移植群より、腫瘍形成の認められる個体を無作為に抽出し、X 線撮影装置 μ FX-100(日本国 フジフィルム社)を用い、添付文書に従って X 線撮影を実施した。X 線撮影は、管電圧 25 kV、管電

流 0.1 mA、照射時間 10 秒で行い、専用イメージングプレートに露光し、BAS2000(日本国 フジフィルム社)を用いて画像解析を行った。

その結果、図 5 に示すとおり、CHO-OST311H 移植個体において骨組織の X 線像輝度の減弱が全身に認められ、石灰化の低下が認められた。また胸郭の変形などの骨格異常も認められた。

(5)血清リン、カルシウム濃度およびアルカリホスファターゼ活性の測定

細胞移植して 44 日と 46 日目に心臓より採血して得た血清を -20℃ で一旦保存した後、一斉に解凍して各血清に含まれるリン濃度、カルシウム濃度を再度測定するとともに、アルカリホスファターゼ活性についても測定した。リン濃度の測定はリン-テストワコー (日本国 和光純薬社) を、カルシウム濃度の測定はカルシウム-テストワコー (日本国 和光純薬社) を、アルカリホスファターゼ活性の測定はカルシウムアルカリ性ホスファ B-テストワコー (日本国 和光純薬社) をそれぞれ用いて実施した。結果を腫瘍非形成群 (n=6)、CHO 腫瘍形成群 (n=10)、CHO-OST190H 細胞腫瘍群 (n=10) 及び CHO-OST311H 腫瘍群 (n=6 x 2) に分類した。CHO-OST311H 群は 44 日目に屠殺した群 (CHO-OST311H-1 : n=6) と 46 日目に屠殺した群 (CHO-OST311-2 : n=6) との 2 つに分類した。図 7 に示すように、CHO-OST311H 腫瘍群において、血清リン濃度の低下 (図 7 A)、血清カルシウムの低下 (図 7 B) および血清アルカリホスファターゼ活性の上昇 (図 7 C) といったいずれも有意な変化が認められた。

(6)腎臓近位尿細管上ナトリウム・リン酸共役輸送担体(NaPi-7)の発現

i) 近位尿細管上皮細胞冊子縁膜(以下、BBM と称す)の調製

CHO-OST311H 腫瘍形成個体および非腫瘍形成個体より、ジエチルエーテル麻醉下、腎臓を摘出し中央部を冠状断に二等分した(実験 1: CHO-OST311H 腫瘍形成個体 6 例、非腫瘍形成個体 4 例、実験 2: CHO-OST311H 腫瘍形成個体 6 例、非腫瘍形成個体 2 例)。それぞれの個体より摘出した 0.5 個分の腎臓を用い、Kessler らが報告したプロトコールに従い、BBM を調製した(Biochem. Biophys. Acta. 506, pp.136-154)。

腎臓を、3 ml のホモジナイズバッファー(50 mM マンニトール, 2 mM Tris/HEPES pH 7.5)中でガラス製ホモジナイザーを用い、1,300 rpm で 2 分間、破碎懸濁し均質な腎臓抽出液を得た。これに終濃度 10 mM となるよう CaCl_2 を加え、4℃で 15 分間攪拌した後、4,900 g で 15 分間、4℃で遠心分離した。得られた上清をキムワイプで濾過した後、さらに 16,200 g で 60 分間、4℃で遠心分離することで、BBM を多く含む画分を沈殿させた。この沈殿物を 5 ml のサスペンションバッファー(50 mM マンニトール, 2 mM Tris/HEPES pH 7.5)中に分散した後、再度 16,200 g で 60 分間、4℃で遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した後、0.1 ml のサスペンションバッファーに溶解した。得られた溶液を定法に従い蛋白質濃度定量を実施したところ、3 から 4 mg/ml であった。

ii) BBM 蛋白質のウェスタンブロッティング

上述の通り、個々のマウスより調製した BBM 蛋白質をそれぞれ $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようサスペンションバッファーで希釈し、1 M Tris-Cl pH6.8、5 % SDS、50 %グリセロール、100 mM DTT を含むサンプルバッファーを $2.5 \mu\text{l}$ 添加し、95℃、5 分間加熱した後、10-20%勾配のポリアクリルアミド電気泳動にて BBM 溶液中の蛋白質を分離した。その後、セミドライブロッティング装置(米国 Owl Separation Systems 社)を用い、ゲル中の蛋白質を Immobilon PVDF 膜(米国 MILLIPORE 社)に転写した。この PVDF 膜を、TTBS バッファー(米国 Sigma 社)中で 1/2000 希釈した抗 NaPi-7 ポリクローナル抗体と室温で 3 時間インキュベーションした。本抗体は、キリンビール株式会社医薬探索研究所内にて、マウス NaPi-7 の C 末端部位に相当する合成ペプチド(LALPAHHNATRL)を定法によりウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体である。本抗体との反応後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と結合した抗ウサギ IgG 二次抗体(デンマーク DAKO 社)とインキュベーションし、ECL 発光システム(米国 Amersham Pharmacia Biotech 社)を用いてバンドを検出した。

還元条件下、本抗体により約 80 kDa、約 35 kDa および約 170 から 200 kDa の高分子スミアが確認される(図 8)。このバンドパターンは、Tatsumi らが、J. Biol. Chem. Vol.273, pp 28568-28575, 1998 に報告している事例と一致すること、また、マウスあるいはラットの食事中リン酸摂取量に応じて、これらのバンドが一様に

変化することがすでに確認されていることから、NaPi-7 由来のポリペプチドであることが判明している。図 8 に示した様に、CHO-OST311H 腫瘍形成個体から調製した BBM 蛋白質に含まれる NaPi-7 のシグナルは、前述の断片すべてにおいて(矢印で示したバンド)、非腫瘍形成個体から調製したそれと比べ、顕著に減弱していた。この結果は、独立して実施した実験 1 および 2 において、再現された。一方、これらの BBM 蛋白質を 10-20% 勾配のポリアクリルアミド電気泳動にて分離後、CBB 染色した結果、それぞれの BBM 蛋白質が一様に染色されたことから、ウェスタンブロットティングにおけるシグナルの減弱は、NaPi-7 に特異的なものであることがわかる(図 8)。この事実より、OST311 蛋白質は腎臓の近位尿細管細胞に作用し、NaPi-7 の発現量を蛋白質レベルで下方修正することにより、低リン酸血症を惹起していることが推察される。

(7) 腎臓および小腸におけるリン酸輸送担体とビタミン D 代謝酵素の mRNA の変動解析

i) トータル RNA の調製

細胞移植後 44 日～46 日目に屠殺したマウスより小腸と腎臓を摘出した。腎臓はドライアイスにて急速に冷凍した。凍結した腎臓は-80℃超低温フリーザー中にて使用時まで凍結保存した。凍結された腎臓 1 個を ISOGEN (日本国 ニッポンジーン社) 5 ml に溶解し、添付文書に従ってトータル RNA を調製した。調製したトータル RNA 15 μ g を常法にしたがって、アガロース濃度 1 % のホルムアルデヒド含有変性ゲルにて電気泳動し、キャピラリートランスファー法によって一夜、Hybond-N+ (米国 アマシャムファルマシア社) に転写した。転写されたフィルターをストラタリンカー (米国 ストラタジーン社) にて UV を照射し、転写された RNA を固定、2XSSC で洗浄後、風乾し、使用時まで室温にて保存した。小腸は生理食塩水にて内容物を洗浄除去し、反転させたのち、プレパラートにて小腸上皮を掻き取り液体窒素にて急速に冷凍した。凍結した小腸上皮は-80℃超低温フリーザー中にて使用時まで凍結保存した。凍結された小腸上皮を ISOGEN (日本国ニッポンジーン) 5 ml に溶解し、添付文書に従ってトータル RNA を調製した。調製したトータル RNA 20 μ g を常法にしたがって、アガロース濃度 1 %

のホルムアルデヒド含有変性ゲルにて電気泳動し、キャピラリートランスファー法によって一夜、Hybond-N+（米国アマシャムファルマシア社）に転写した。転写されたフィルターをストラタリンカー（米国ストラタジーン社）にてUVを照射し、転写されたRNAを固定、2XSSCで洗浄後、風乾し、使用時まで室温にて保存した。

ii) プロブ用鋳型DNAの調製

個体番号1のマウスより調製したトータルRNA 5 μ gを用いて20 μ Lの反応液中(50mM Tris(pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 25g/mL (dT)18, 2.5mM dNTP, MMLV 逆転写酵素（日本国 東洋紡）200units）、37℃、1時間cDNAを合成させた後、70℃、15分間処理して酵素を失活させた。合成されたcDNAは5倍に希釈し、以下の反応に使用した。

GenBank（米国NCBI）に登録されている配列から以下のプライマーを合成し、PCR反応に使用した。

マウス GAPDHcDNA 取得用合成プライマー

mGAPDHFw TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC（配列番号30）

mGAPDHRV CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC（配列番号31）

マウス Npt-1cDNA 取得用合成プライマー

mNpt1FW GTAAAGAACCCTGTGTATTCC（配列番号32）

mNpt1RV CTGCCTTAAGAAATCCATAAT（配列番号33）

マウス NaPi-7cDNA 取得用合成プライマー

mNaPi7FW GAGGAATCACAGTCTCATTC（配列番号34）

nNaPi7RV CTTGGGGAGGTGCCCCGGGAC（配列番号35）

マウス NaPi-2b cDNA 取得用合成プライマー

mNaPi2bFW TCCCTCTTAGAAGACAATACA（配列番号36）

mNaPi2bRV GTGTTTAAAGGCAGTATTACA（配列番号37）

マウスビタミンD 1 α 水酸化酵素 cDNA 取得用合成プライマー

m1 α OHaseFW CAGACAGAGACATCCGTGTAG（配列番号38）

m1 α OHaseRV CCACATGGTCCAGGTTTCAGTC（配列番号39）

マウスビタミンD 24水酸化酵素 cDNA 取得用合成プライマー

m24OHaseFW GACGGTGAGACTCGGAACGT (配列番号 40)

m24OHaseRV TCCGGAAAATCTGGCCATAC (配列番号 41)

TakaLa LA-Taq (日本国宝酒造) の添付文書にしたがって反応液を調製し、50 mL 反応液中に上記 cDNA 1 μ L、及びプライマー各 10 pmol を添加し、94°C で 1 分保温したのち、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分のインキュベーションを 1 サイクルとして 40 サイクル増幅し、0.8% アガロースゲル電気泳動にて増幅バンドを分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101 社) を用いて目的の断片を回収した。GAPDH に関しては本操作で得られた断片を鋳型としてメガプライムラベリングキット (米国 アマシャムファルマシア社) を用いて ³²P 標識プローブを調製し、以下のハイブリダイゼーションに使用した。他の遺伝子については取得した PCR 断片を pGEM-T ベクター (米国プロメガ) に組みこみ、大腸菌 DH5 α に導入した。T7 (配列番号 42) 及び SP6 プライマー (配列番号 43) を各 10 pmol 添加した PCR 反応液に形質転換大腸菌を添加し、94°C で 10 分保温したのち、94°C にて 30 秒、55°C にて 30 秒、72°C にて 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル増幅した。反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動にて増幅バンドを分離してジーンクリーン II (米国 Bio101) にて目的の断片を抽出した。

T7 TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号 42)

SP6 GATTTAGGTGACACTATAG (配列番号 43)

以上の操作によって得られた増幅断片の塩基配列は、ABI377 DNA シーケンサー (米国 PE アプライドシステムズ社) を用いて決定し、それぞれ目的の断片を取得したことを確認した。このようにして得た DNA 断片をメガプライムラベリングキット (米国 アマシャムファルマシア) を用いて ³²P 標識し、以下のハイブリダイゼーションにおいてプローブとして使用した。

iii) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは ExpressHyb ハイブリダイゼーション溶液 (米国 クロンテック社) または Perfecthyb ハイブリダイゼーション溶液 (日本国 東洋紡) を用いて、添付文書に従って実施した。ハイブリダイゼーション、洗浄終了後、イメージングプレート (日本国 富士フィルム社) に 30 分から 1 夜の間露光し、BAS2000 イメージアナライザー (日本国 富士フィルム社) にて解析し

た（図 9A～C）。併せて目的のバンドのシグナル強度を測定した。それぞれの遺伝子のシグナル強度を GAPDH のシグナル強度で補正したのち、非腫瘍形成群（個体番号 1～4）と腫瘍形成群（個体番号 5～10）の平均値の比を求めた。以下の表 5 にその値を記す。CHO-OST311H 腫瘍形成に伴い、腎臓の I 型のリン酸輸送担体（NPT-1）は大きく変動しなかったが、腎臓の II 型リン酸輸送担体である NaPi-7 の mRNA は顕著に減少した。また、小腸のリン酸輸送担体である NaPi-IIb の mRNA も顕著な減少が認められた。一方、腎臓のビタミン D 代謝酵素に関しては、25-hydroxyvitaminD-1- α -hydroxylase（1 α OHase）と 25-hydroxyvitaminD-24-hydroxylase（24OHase）の mRNA がともに上昇していた。

表 5. 非腫瘍形成群に対する腫瘍形成群の各 mRNA の比率

（腫瘍形成群／非腫瘍形成群）

NPT-1	0.88
NaPi-7	0.50
NaPi-2b	0.23
ビタミン D 1 α 水酸化酵素	3.90
ビタミン D 24 水酸化酵素	1.94

(8) 血清 1,25-dihydroxyvitamin D 濃度の測定

腫瘍移植後 44 日目および 46 日目に採取したコントロール群マウスの血清と OST311H 群マウスの血清を各個体より等量ずつ採取して、総量 0.5ml として三菱化学ビーシーエルに提出し、血清に含まれる 1,25-ジヒドロキシビタミン D の濃度を、臨床検査と同様の方法で測定した。その結果、コントロール群と OST311 群の血清中 1,25-ジヒドロキシビタミン D の濃度は、それぞれ 28.0pg/ml と 23.9pg/ml であった。上述のとおり、低リン酸血症、低カルシウム血症が認められるにも関わらず、1,25-ジヒドロキシビタミン D の濃度が上昇しないことは、明らかに OST311 による作用の結果としてビタミン D 代謝が影響を受けていることを示すものである。

(9) 大腿骨の X 線撮影

非腫瘍形成マウスと CHO ras clone-1、CHO-OST190H、CHO-OST311H を移植したマウスを移植後 44 日目から 46 日目に屠殺して大腿骨を採取し、4 %の中

性ホルマリンで3日間固定した。その後、骨周囲の軟組織を除去して、各群より2個体を無作為に抽出して、X線撮影装置 μ FX-100（日本国 フジフィルム社）を用いて、管電圧 25 kV、管電流 0.1 mA、照射時間 5 秒でX線を照射し、イメージングプレートを露光した。その結果を図 10 に示す。CHO-OST311H 群で皮質骨の骨梁骨の減少が認められた。

実施例 12 OST311 の塩基配列相同性とゲノム領域の解析

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列および配列番号 1 に示される塩基配列の少なくとも一部を用いて、OST311 に相当する分子を種を超えて検索することができる。配列番号 1 の一部の塩基配列を用いてマウスのゲノム配列データベースを検索することで Genbank にアクセッション番号 AC0 15538 で登録されているマウス 6 番染色体の配列中に、OST311 と相同性の高い配列を見出した。この配列より得られたマウス OST311 の部分ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 10 に、cDNA の部分配列に相当する塩基配列を配列番号 9 に示した。ヒト OST311 ポリペプチドとマウス OST311 のポリペプチドとの間におけるアミノ酸の相同性を比較した結果を図 6 に示す。実施例 11 で示したように、ヒトのアミノ酸配列を有する OST311 ポリペプチドは、マウスにおいて明確な生物活性を有していることが明らかとなった。これらのことは図 6 に示すアミノ酸配列で相同性の低い領域のアミノ酸を置換したり欠失させたり、若しくはアミノ酸を挿入したりしても活性が保持されやすいことを示す。

配列番号 1 に示す塩基配列をデータベースで一致する領域が認められたヒト 12p13 BAC RPCI11-388F6（アクセッション番号 AC008012）と照合して、OST311 がコードされる領域の配列を同定した。配列番号 11 に OST311 の遺伝子近傍の塩基配列を示した。配列番号 11 の塩基番号 498 番から 502 番に TATAA ボックスがある。配列番号 11 の塩基番号 1713 番から本発明者が同定した cDNA 配列（配列番号 1）と一致する配列が出現し、2057 番まで続く。次に配列番号 1 に示した塩基配列と一致する部分は、配列番号 11 の塩基番号 8732 番から 8833 番までである。ここは exon 2 と考えられる。そして最後に現れる配列番号 1 に示した塩基配列と一致する部分は配列番号 11 の塩基番号 10644 番から始まり、

配列番号 11 の塩基番号 12966 番が配列番号 1 の塩基配列と一致する末尾である。この配列番号 11 の塩基番号 498 番から塩基番号 12966 番までの配列は OST311 をコードする遺伝子の少なくとも一部であると考えられる。また、exon 1 と exon 2 との間には Genbank にアクセッション番号 G19259 で登録されている STS 配列があることが判明した。OST311 は、12p13 領域にあるが Econs, M.J. et al., J. Clin. Invest. 100:2653-2657, 1997 によると、常染色体性のビタミン D 抵抗性くる病 (ADHR) の責任遺伝子は、連鎖解析の結果、12p13 のマイクロサテライトマーカーである D12S100 と D12S397 との間の 18 cM 内 (特に D12S314 と D12S397 の間の約 10 cM) に存在することが推定されている。本発明者は、OST311 の遺伝子と上記マイクロサテライトマーカーの 12 番染色体上の物理的位置を調べた。その結果、D12S100 および D12S314 が 4602~6129 kb、OST311 が 8958~9129 kb、D12S397 が 16280~16537 kb という結果を得た。これらの結果と、OST311 が持つ強力なリン代謝調節活性とを考えると、OST311 が ADHR の責任遺伝子であるということが分かった。

実施例 13 CHO-OST311H 細胞のヌードマウスへの短期移植試験

CHO-OST311H 細胞をヌードマウス (6 週齢, BALB/c, 雄) の背部皮下に移植し、2 日後および 6 日後における血清リン酸、カルシウム濃度を測定して、組換え OST311 が短期間で与える影響について検討した。実験対照として CHO ras clone-1 細胞を同様に移植実験に用いた。

(1) CHO 細胞移植

実施例 11 の (1) に記載した方法と同様に、CHO-OST311H 細胞および CHO ras clone-1 細胞を 2×10^7 個ずつヌードマウスに皮下移植した (n=6 ずつ)。また、同容量の PBS を同様に皮下移植した (n=6)。各群 6 匹毎を、プラスチックケージで飼育し、固形食 CE-2 (日本国 日本クレア社) および水道水を自由摂取させた。移植して 6 日間経過した時点において、顕著な腫瘍形成は認められなかった。

(2) 細胞移植後 2 日目における血清リン、カルシウム濃度の測定

細胞移植した翌日、エーテル麻酔下、眼窩採血を実施した。末梢血は、マイクロ

テイナ(米国 ベクトンディッキンソン社)により血清分離した。血清リン濃度の測定はリン-テストワコー(日本国 和光純薬社)を、血清カルシウム濃度の測定はカルシウム-テストワコー(日本国 和光純薬社)をそれぞれ用いて実施した。図 11A に示すように、PBS 投与群および CHO ras clone-1 細胞移植群に比し、CHO-OST311H 細胞移植群は全例において、血清リン酸濃度の有意な低下を認めた。一方、血清カルシウム濃度においては、変化は認められなかった。これらの結果から、OST311 は投与 2 日後において、血清リン酸濃度のみを低下させることが明らかとなった。

(3) 細胞移植後 6 日目における血清リン、カルシウム濃度の測定

細胞移植後 6 日目、エーテル麻酔下、心採血を実施した。上述のごとく、各群の血清リン酸、カルシウム濃度をそれぞれ測定した。図 11B に示すように、移植後 2 日目と同様、PBS 投与群および CHO ras clone-1 細胞移植群に比し、CHO-OST311H 細胞移植群は全例において血清リン酸濃度の有意な低下を認めた。一方、CHO-OST311H 細胞移植群は全例において血清カルシウム濃度の若干の低下を認めた。

実施例 14 組換え体 OST311 の精製

CHO-OST311H 細胞を 225 cm² 培養フラスコ(米国 コーニング社)で 37℃、5% CO₂、湿度 100% 下、10% FCS 入り MEM α 培地でフラスコ面積の約 80% を占めるまで増殖させた後、培地を無血清培地 CHO-S-SFM II(米国 LIFE TECHNOLOGY 社)50 ml に置き換え、48 時間後に上清を回収した。この要領で得られた、計 1,000 ml の培養上清を用いて、以下の方法で組換え OST311 を精製した。

培養上清 1000 ml を、16,200 g で 15 分間、4℃ で遠心分離し、浮遊細胞を除去した後、上清を内径 30 mm × 長さ 200 mm のガラスカラムにパッキングした SP-sepharose FF(アマシャムファルマシア社、米国)に供し、その素通り画分を金属キレートレジンは Talon Superflow(CLONTECH 社、米国)に吸着させた。非特異的な吸着物を 50 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.6)および 0.3 M NaCl

からなる洗浄バッファーで除いた後、50 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.7)および 0.2 M Imidazole で溶出した。図 12 の右パネルには、抗 His6 抗体 (INVITROGEN 社、米国)を用いてこの溶出画分を検出したウェスタンブロッティングの結果を示す。この画分には、実施例 9 に記載したアミノ酸残基 180 番 Ser から 251 番 Ile からなる部分ポリペプチド(配列番号 8)が含まれている。一方、前述の SP-sepharose FF に吸着した培養上清中に含まれる蛋白質は、50 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.7)および 0 から 0.7 M までの NaCl 濃度勾配を用いて溶出させた。図 12 の左パネルには、抗 His6 抗体(INVITROGEN 社、米国)を用いて検出したウェスタンブロッティングの結果を示す。この約 0.3M NaCl で溶出される画分には、実施例 9 に記載したアミノ酸残基 25 番 Tyr から 251 番 Ile からなる部分ポリペプチド(配列番号 4)が含まれている。また、図 12 の中央パネルは、実施例 10 で記載した OST311 部分ペプチド(配列番号 29)を用いて作製したポリクローナル抗体(311-114)によって検出したウェスタンブロッティングの結果を示す。この約 0.4 M NaCl の濃度で溶出される画分には、実施例 9 に記載したアミノ酸残基 25 番 Tyr から 179 番 Arg からなる部分ポリペプチド(配列番号 6)が含まれている。このようにして、3 種類の OST311 部分ペプチド、即ち、配列番号 4(以下 311:25-251 と称す)、配列番号 6(以下 311:25-179 と称す)、配列番号 8(以下 311:180-251 と称す)を含む画分は精製分離された後、限外分子量 10,000 の VIVASPIN カラム(ザルトリウス社、米国)を用いて濃縮し、1ml の 5 mM HEPES (pH 6.9)および 0.1 M NaCl からなる溶媒に置換された。

実施例 15 骨非脱灰切片の組織学的検討

実施例 11 で作製した CHO-OST311H 細胞移植マウスと腫瘍なしマウスの屠殺時に、右大腿骨と脛骨を、その膝関節で結合した状態で摘出した。そして脛骨骨幹部と大腿骨骨幹部で切断し即座に氷冷しておいた中性ホルマリン中に保存し、非脱灰標本作製した。以下に非脱灰標本の作製方法を記載する。

骨組織を Villanueva bone stain にて 3～7 日間前染色を行った。アルコール脱水列で脱水後アセトンで置換し、アセトン・モノマー、モノマーを通した後に樹脂包埋を行った。樹脂は包埋用メタクリル酸メチル (MMA) 樹脂を用い、樹

脂内に組織が十分に包埋されるように適宜 MMA を追加しながら、約 35℃ の恒温器に入れて完全重合させた。ここで用いた包埋用 MMA は、MMA モノマー（日本国、和光純薬工業社）100 ml に対して、MMA ポリマー（日本国、和光純薬工業社）を 40 g 加えて完全に溶解させた後、Benzoyl peroxide（日本国、ナカライテスク社）を 1 g の割合で加えて、完全に溶解させたものである。標本は脛骨に対して作製することとし、脛骨の海面骨が観察できるように前額断面でトリミングを行ったのちに硬組織用ミクロトーム（RM2065 型スーパーカット、ライカ社製）を用いて厚さ 4 μm の前額断面標本を作製した。後染色として Villanueva goldner 染色を実施した。このようにして得られた標本はキシレン透徹後にクリアシール（日本国、マルトー社）およびワンライト（日本国、マルトー社）を用いて封入した。

標本の顕微鏡観察像を図 13 に示す。CHO-OST311H 腫瘍マウスでは対照に比して、成長板幅の増大が認められた。また骨幹端部において、著しい類骨の増大と石灰化領域の減少が認められた。繊維性骨炎の所見は認められず、CHO-OST311H 腫瘍マウスより採取した骨は典型的な骨軟化症の所見を呈していた。

実施例 16 CHO-OST311H 細胞移植後早期におけるビタミン D 代謝の検討

OST311 のビタミン D 代謝へ与える影響を検討するため、実施例 13 に記載した方法と同様に、CHO-OST311H 細胞のヌードマウス(6 週齢, BALB/c, 雄)への移植試験を実施した。実験対照として、CHO ras clone-1 細胞を同様に移植した群、及び細胞懸濁液と同用量の PBS を投与した群の 2 群を設置して比較に用いた。各群は 6 匹のマウスから構成され、各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水並びに 1.03% の無機リン酸および 1.18% のカルシウムを含んだ固形食 CE2(日本クレア社, 日本国)を自由摂取させた。移植後、1, 2, 3, 6 日目における血清 1,25-ヒドロキシビタミン D 濃度の変動およびビタミン D 代謝酵素群の発現変化を検討した。

(1) 血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の測定

細胞移植後 1, 2, 3, 6 日目において、PBS 投与群、CHO-ras clone-1 細胞移植群および CHO-OST311H 細胞移植群のマウスより、エーテル麻酔下、心採血を実施し、

マイクロテイナ(ペクトンディッキンソン社、米国)を用いて血清を分離した。各群毎に、個々のマウスより得られた血清を等量ずつ混合し、総量を 0.25 ml として、これらに含まれる 1,25-ジヒドロキシビタミン D の濃度を、1,25(OH)₂D RIA キット「TFB」(テイエフビー社、日本国)を用いて測定した。その結果、表 6 に示すように、PBS 投与群、CHO-ras clone-1 細胞移植群に比し、CHO-OST311H 細胞移植群において、移植後 1 日目ですでに 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の有意な低下を認めた。この低下作用は、移植後 2、3、6 日目においても認められた。この結果は、腫瘍性骨軟化症における顕著な臨床所見の一つである、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の低下と一致している。

表 6 細胞移植マウスにおける血清 1, 25-ジヒドロキシビタミン D 濃度

移植後日数	1	2	3	6
PBS 投与群 (pmol/L) n=5	338	164.3	164.5	273.7
CHO-ras clone-1 移植群 (pmol/L) n=6	271.9	178.3	182.9	184.6
CHO-OST311 移植群 (pmol/L) n=6	46.7	36.3	34.5	49.1

(2) 腎臓におけるビタミン D 代謝酵素遺伝子の発現解析

上述の 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 低下作用が、腎臓に発現する 25-ヒドロキシビタミン D-1- α -水酸化酵素(1 α OHase)あるいは、25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素(24OHase)遺伝子の変動に起因するかを検討するため、移植後 3 日目の PBS 投与群、CHO-ras clone-1 細胞移植群および CHO-OST311H 細胞移植群より、それぞれ 3 または 4 匹のマウスを無作為に抽出し、腎臓を摘出後、実施例 11(7)に記載した手順に則りトータル RNA を調製し、同記載のプロープを用いてノザンブロッティングを実施した。その結果を図 14 に示す。PBS 投与群、CHO-ras clone-1 細胞移植群に比し、CHO-OST311H 細胞移植群において 1 α OHase 遺伝子の mRNA 発現レベルが顕著に減弱していることを認めた。このことは、OST311 が直接的あるいは間接的に、本遺伝子の発現を抑制することで、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D の生合成を抑制している可能性を示唆している。一方、24OHase 遺伝子の mRNA 発現レベルは、PBS 投与群、CHO-ras clone-1 細胞移植群に比し、CHO-OST311H 細胞移植群において有意に亢進していた。こ

のことは、OST311が直接的あるいは間接的に、本遺伝子の発現を亢進することで、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D の不活性化を促進している可能性を示唆している。

実施例 11(8)では、移植後 44, 46 日目の血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度は対照群と比し、有意な差が認められていない。また、 1α OHase の mRNA 発現量が増加傾向にあった点が、本実施例における結果と異なる。その相違を説明する少なくとも一つの可能性として、実施例 17 に記載した、血清中副甲状腺ホルモンの影響が考えられる。

実施例 17 CHO-OST311H 細胞移植後早期における血清中副甲状腺ホルモン濃度の検討

実施例 11, 13 および 16 で記載した CHO 細胞移植後 1, 2, 3, 6, 45 日目における各マウス血清を等量ずつ混和して 0.15 ml とし、Rat PTH IRMA キット(日本メジフィジクス社)を用いて添付文書に従い血清副甲状腺ホルモン濃度を測定した。表 7 に示すように、CHO-OST311 移植群で有意な血清副甲状腺ホルモンの上昇が認められ、その差は移植後 45 日目において顕著であった。

表 7 細胞移植マウスにおける副甲状腺ホルモン濃度

移植日数	1	2	3	6	45
PBS 投与群 (pg/ml) n=5	45.2	23.8	28.2	19.7	¹ 41.9
CHO-ras clone-1 移植群 (pg/ml) n=6	15.8	26.6	15.7	13.8	² 40.4
CHO-OST311 移植群 (pg/ml) n=6	13.8	20.6	44	57.8	³ 211.7

¹ 腫瘍無しマウス(n=6)を用いた測定値。 ² n=10。 ³ n=12。

実施例 18 CHO 産生型組換え OST311H 全長蛋白質の正常マウスへの投与試験

CHO 産生型組換え OST311H 全長蛋白質の正常マウス(BALB/c, 雄, 6 週齢)への作用を検討するため、実施例 14 の(1)で示した精製法により、アミノ酸残基 25 番目 Tyr から 251 番目 Ile (配列番号 4)の C 末端にヒスチジンタグを付与したポリペプチドを部分精製した。この精製画分を正常マウスの腹腔内へ 1 回あたり 0.1 ml ずつ投与した。本精製画分中には、ウェスタンブロッティングで得られた蛍光

強度から、およそ 0.15~0.75 μg の組換え OST311 が含まれると推定される。対照群へは、実施例 14 と同様に、溶媒(5 mM HEPES 緩衝液/0.1 M NaCl pH=7.0)を 0.1 ml ずつ腹腔内に投与した。OST311 投与群および対照群はそれぞれ 5 匹のマウスから構成され、各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水および 1.03%の無機リン酸および 1.18%のカルシウムを含んだ固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

[試験 1]

試験概略を図 15 の A に示す。第 1 回目腹腔内投与から数えて 5、10、23、28、33 時間後に追加投与をおこない、合計 6 回の腹腔内投与を実施した。その後、第 1 回目腹腔内投与から数えて 36、47、71 時間後にガラス製キャピラリーを用いて眼窩より採血し、マイクロテイナ(ベクトンディッキンソン社、米国)を用いて血清を分離した。

得られた血清中のリン酸およびカルシウム濃度を、リン-テストワコーあるいはカルシウム-テストワコー(和光純薬、日本国)を用いて添付文書に従い、決定した。その結果、図 15 の B に示すように、初回投与から 36 時間後の OST311 投与群において、有意な血中リン低下作用を認めた(t-test $**p < 0.001$, $*p < 0.01$)。また、この作用はその後 11 時間経過後においても維持された(初回投与から 47 時間後)。一方、初回投与 71 時間後(最終投与後 38 時間後)には、本活性は消失していた。また、いずれの時間においても、血中カルシウム濃度には有意な変化は認められなかった(図 15 の C)。

[試験 2]

試験概略を図 16 の A に示す。第 1 回目腹腔内投与から数えて 5、11 時間後に追加投与をおこない、合計 3 回の腹腔投与を実施した。その後、第 1 回目腹腔内投与から数えて 13、24 時間後にガラス製キャピラリーを用いて眼窩より採血し、マイクロテイナ(ベクトンディッキンソン社、米国)を用いて血清を分離した。得られた血清中のリン酸およびカルシウム濃度をリン-テストワコーおよびカルシウム-テストワコーをそれぞれ用いて添付文書に従い測定した。その結果、図 16 の B に示すように、13 時間後の OST311 投与群において、有意な血清リン酸濃度低下作用を認めた(t-test $**p < 0.05$, $*p < 0.01$)。また、この作用はその後 11 時間経過後に

においても維持された。また、いずれの時間においても血中カルシウム濃度には有意な変化は認められなかった(図 16 の C)。

試験 1 および 2 の結果から、CHO 産生型組換え OST311 蛋白質の全長画分が、腹腔内投与により、正常マウスに低リン血症を惹起すること、またその血清リン酸濃度低下作用は初回投与後 13 時間後に既に認められること、さらにその活性は投与中止後少なくとも 11 時間は持続することが判明した。

実施例 19 OST311 へのアミノ酸変異導入

実施例 9 に記載したように、CHO-OST311H 細胞により生産される組換え OST311 の一部は産生過程において、アミノ酸残基 25 番目 Tyr から 179 番目 Arg までの配列を有するポリペプチド(配列番号 6)およびアミノ酸残基 180 番目 Ser から 251 番目 Ile までの配列を有するポリペプチド(配列番号 8)に切断されることが判明している。

この切断は、アミノ酸残基 180 番目 Ser 直前にある RXXR もしくは、RRXXR 配列からなるモチーフを認識するプロテアーゼによる可能性が考えらる。全長型組換え体を生体内に投与した際にも、この切断あるいはそれに類似した分解を受ける可能性が考えられる。そこで、アミノ酸残基 176 番目の Arg およびアミノ酸残基 179 番目の Arg の両者を Gln に置換しうる配列をコードする変異導入遺伝子 OST311RQ を作製した。

(1) OST311/pCAGGS プラスミドの作製

OST311H/pcDNA3.1 プラスミドを鋳型として 311F1EcoRI(配列番号 22)及び 311LNot(配列番号 44)をプライマーに用い、LA Taq ポリメラーゼ(日本国、宝酒造社)による PCR を行った。反応は、94℃、1 分保温したのち、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル実施した。反応終了後、PCR 産物の末端を T4 DNA ポリメラーゼ(スイス、ロッシュ社)により平滑化し、フェノールクロロホルム処理によって酵素を失活させた。DNA をエタノール沈殿させたのち、ポリヌクレオチドキナーゼ(スイス、ロッシュ社)によって DNA 末端のリン酸化を行なった。0.8%アガロースゲル電気泳動によって、目的の DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II(米国、BIO101 社)を用いて回収した。プラス

ミドベクターpCAGGS(Niwa H, et al., Gene. 1991 Dec 15;108(2):193-9.)を *EcoRI* で消化し、Klenow 断片 (スイス、ロッシュ社) を用いて末端の平滑化を行った。続いて牛小腸アルカリフォスファターゼ (日本国、宝酒造社) を用いて DNA 末端の脱リン酸化を行い、0.8%アガロースゲル電気泳動によって目的の DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国、BIO101 社) を用いて回収した。DNA ライゲーションキットバージョン 2 (日本国、宝酒造社) を用い、添付文書に従って得られた OST311cDNA と pCAGGS プラスミド消化物を結合させた。これを大腸菌 DH5 α に導入してクローン化し、目的のプラスミドを取得した。本プラスミド DNA を OST311RQH 遺伝子の作製に使用した。

311LNot:ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA (配列番号 44)

(2)OST311RQH 遺伝子の作製

以下のプライマーを合成した。

OST311ME1: ATGAATTCCACCATGTTGGGGGCCCCGCCTCAGG (配列番号 45)

OST311HNT:

ATGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGGATGAACTTGGCGAAGGG
(配列番号 46)

OST311RQF: ATACCACGGCAGCACACCCAGAGCGCCGAG (配列番号 47)

OST311RQR: CTCGGCGCTCTGGGTGTGCTGCCGTGGTAT (配列番号 48)

OST311ME1 は OST311 の開始メチオニンを含む部分の順方向プライマー、OST311HNT は OST311 の 3'末端に 6 個のヒスチジンを付加する逆方向プライマー、OST311RQF 及び OST311RQR は OST311 cDNA のコード領域中 527 番目及び 536 番目のグアニン(配列番号 1 の 659 番目および 668 番目のグアニンに相当)をそれぞれアデニンに置換することで、アミノ酸番号 176 番目及び 179 番目のアルギニンをグルタミンに置換するための変異導入用の、それぞれ順方向、逆方向プライマーである。pfu DNA ポリメラーゼ (米国、プロメガ社) を用い、添付文書に従って 2 種類の反応液を 20 μ L 調製した。一方にはプライマーとして OST311ME1、OST311RQR を終濃度 0.2 μ M で使用し、鋳型には実施例 6 の(1)

に記載した OST311 発現ベクター 10 ng を使用した。94℃、1 分保温したのち、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル PCR 反応を実施した。もう一方にはプライマーとして OST311RQF、OST311HNt を終濃度 0.2 μ M で使用し、鋳型には OST311/pCAGGS プラスミド 10 ng を使用した。94℃、1 分保温したのち、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル PCR 反応を実施した。上記 2 種類の反応物をそれぞれ 10 倍に希釈し、それぞれ 1 μ L を LA Taq ポリメラーゼ(日本国、宝酒造社)添付文書に従って調製した反応液 50 μ L に添加した。LA Taq ポリメラーゼ(日本国、宝酒造社)を用いて、プライマーとして OST311 ME1、OST311HNt を終濃度 0.2 μ M で使用し、94℃、1 分保温したのち、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル PCR 反応を実施し、さらに 72℃で 7 分保温した。得られた反応生成物をフェノール/クロロホルム処理し、除蛋白、エタノール沈殿を行った後、*Eco*RI、*Not*I で消化し、2%アガロースゲル電気泳動によって約 800 bp の DNA 断片を分離、ジーンクリーン II (米国、Bio101 社)を用いて回収した。得られた DNA 断片を、プラスミド pEAK8 (米国、エッジバイオシステム) に、分子内リボゾームエントリー部位(IRES)および増強型緑色蛍光蛋白質(EGFP)を連結することにより作製したベクター IRES-EGFP-pEAK8 の *Eco*RI、*Not*I 部位に挿入することによって OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 プラスミドを得た。常法に従ってプラスミド DNA を調製、ABI3700 蛍光 DNA シークエンサー (米国、PE アプライドシステムズ社)によって塩基配列を決定し、目的の R176Q および R179Q の変異が導入され、かつ、C 末端にヒスチジンタグをコードしていることを確認した。本遺伝子でコードされるポリペプチドを、以下 OST311RQH と称す。

(3)CHO 安定発現細胞の取得

トランスフェクタム(米国、プロメガ社)を用い、添付文書にしたがって、CHO-ras clone-1 細胞に OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 プラスミドを導入した。5 μ g/mL ピューロマイシン、10% FCS を含む MEM α 培地にて薬剤耐性細胞を選択し、FACS vantage(米国、ベクトンディッキンソン社)によって、GFP(Green

Fluorescent Protein)の発光強度が強い細胞をソーティングによりクローン化した。クローン化した細胞がコンフルエントになったところで、血清を含まない DF (DMEM/F-12) 培地に置換し 2 日後に上清を回収した。回収した上清 50 μ L を 96 ウェルコンバーチブル濾過装置(米国、ライフテックオリエンタル社)を用いてイモビロン P フィルター (米国、ミリポア社) に吸着させた。作製したフィルターを TBS, TTBS で洗浄後、ブロックエース (日本国、第一製薬社) で 1 時間室温にてブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロックエースで 5,000 倍に希釈した HRP 標識した抗 His6 モノクローナル抗体 (米国、インビトロジェン社) と 1 時間反応させた。反応後 TTBS, TBS で洗浄し、ECL (米国、アマシャムファルマシア社) を用い、添付文書に従ってシグナルの検出を行った。このシグナル強度をもとに高発現クローン CHO-OST311RQH を選択した。

(4) OST311RQH pEAK rapid 培養上清の調製

pEAK rapid 細胞(米国、エッジバイオシステム)を組織培養用フラスコ (225cm², 米国、コーニング社) 20 本に播種した。この細胞に pEAK システム添付文書 (米国、エッジバイオシステム社) に従い、OST311RQH/IRES-GFP/pEAK8 プラスミド 0.48 mg をリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした。4 時間静置したのち、フラスコ 1 本あたり 50 mL の血清を含まない MEM α 培地に置換した後、2 日間、37℃にて培養してその上清を回収した。

(5) 組換え OST311RQH の発現確認

上述の CHO-OST311RQH 細胞クローン 2 種類、及び pEAK rapid 細胞を用いた一過性発現の培養上清それぞれ 10 μ L を実施例 6 の(3)に記載した要領でウェスタンブロットに供し、培養上清中の組換え OST311RQH の存在を検討した。検出抗体には、抗 His(C 末)抗体(米国、インビトロジェン社)を用いた。その結果、図 17に示すように、いずれの培養上清中においても、実施例 6 の(3)に記載した約 32 kDa のバンドと同位置に存在する強いシグナルを認めた。さらに、いずれの培養上清中においても、CHO-OST311H 培養上清中に存在する約 10 kDa のシグナルをウェスタンブロットティングでは認めなかった。このことから、R176Q および

R179Q の変異を導入することにより、この位置で起こっていると推定されるポリペプチドの切断が阻害あるいは軽減され、その結果アミノ酸番号 180 番目 Ser から 251 番目 Ile までの配列を有するポリペプチド(配列番号 8)の存在比が顕著に減少したことが推察される。

実施例 20 組換え OST311RQH の正常マウスへの投与試験

実施例 19 の(5)で調製した培養上清 500 ml より、実施例 14 の(1)に記載した方法に準じて、約 2.8 $\mu\text{g/ml}$ の組換え OST311RQH 蛋白質を含む精製画分を得た。この精製画分を正常マウス(BALB/c、雄、6 週齢)の腹腔内へ 1 回あたり 0.1 ml ずつ連続投与し、血清リン酸、カルシウム、1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度を測定した。対照群については、溶媒(5 mM HEPES 緩衝液/0.1 M NaCl pH=7.0)を 0.1 ml ずつ同様に腹腔内へ投与した。OST311RQH 投与群および対照群はそれぞれ 6 匹のマウスから構成され、各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水および 1.03% の無機リン酸および 1.18% のカルシウムを含んだ固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

試験プロトコールを図 18 の A に示す。初回投与開始から 5、10、24、29、34 時間後に追加投与を実施し、計 6 回の連続投与とした。途中、初回投与から 24 時間後(4 回目投与直前)にガラス製キャピラリを用いて眼窩採血を実施し、初回投与から 48 時間後にエーテル麻酔下、心採血を行った。

(1)血清リン酸、カルシウム濃度の測定

初回投与後 24 時間目および 48 時間目の血清より、実施例 14 の(3)に記載した方法で血清リン酸を測定した。その結果、図 18 の B に示す通り、いずれの採血時間においても OST311RQH 投与群は有意な低リン血症を示した(t-test ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)。一方、血清カルシウム濃度に有意な変動は認められなかった(図 18 の C)。

(2)血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の測定

初回投与後 48 時間目において個々のマウスより採取した血清を等量ずつ各群

毎に混和し、実施例 16 の(1)に記載した方法で、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度の測定を行った。その結果、対照群が 244.7 pmol/L を示したのに比し、OST311RQH 投与群は 24.6 pmol/L と顕著な低下を示した。

実施例 21 CHO-OST311RQH 細胞移植試験

実施例 19 の(3)で樹立した OST311RQH 安定発現細胞 CHO-OST311RQH のヌードマウス(7 週齢、BALB/c-nude、雄、n=8)への移植試験を、実施例 13 に記載した方法と同様に実施した。対照群として CHO ras clone-1 細胞を同様に移植した(n=6)。各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水および 1.03%の無機リン酸および 1.18%のカルシウムを含んだ固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

細胞移植後 2 日目において、ガラス製キャピラリーを用いて眼窩採血を実施し、実施例 14 の(3)に記載した同様の方法で血清リン酸、カルシウム濃度の測定を行った。図 19 の A に示すとおり、CHO-OST311RQH 細胞移植群において有意な血清リン酸の低下を認めた(t-test * $p < 0.001$)。一方、血清カルシウム濃度に有意な変化は認められなかった(図 19 の B)

実施例 22 抗 OST311 部分ペプチドポリクローナル抗体の作製(2)

実施例 10 に記載した要領で、さらに OST311 の部分ペプチド 4 種類を作製した(配列番号 49 から 52)。それらを抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清を用いて実施例 6 の(3)に記載した方法に準じてウェスタンブロッティングを実施し、CHO-OST311H 細胞の無血清培養上清中の組換え OST311H を検出した。抗体反応は、各々のペプチドに対する抗血清を TTBS で 250 倍希釈した液中で、4℃で一晩振とうさせて行った。洗浄後、これにアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体(デンマーク、DAKO 社)を結合させた後、アルカリフォスファターゼ発色キット(米国、BIO-RAD 社)を用いて組換え OST311 を検出した(図 20)。

部分ペプチド

311-148: GMNPPPYSQLSRNEC (配列番号 49)

311-170: CNTPIPRRHTR (配列番号 50)

311-180: SAEDDSERDPLNLKLC (配列番号 51)

311-210: LPSAEDNSPMASDC (配列番号 52)

実施例 23 OST311 蛋白質検出用 ELISA システムの構築

(1) 抗 OST311 部分ペプチドウサギ抗血清からの抗体精製

Econo-Pac disposable chromatography column (米国、BIO-RAD 社)に protein A sepharose 4FF(米国、Amersham pharmacia 社)をスラリーで 3 ml 充填し、10 ml の 0.1 M グリシン塩酸緩衝液(pH 3.3)および、20 ml の PBS を用いて洗浄した。実施例 10 に記載した 2 種類および実施例 22 に記載した 4 種類のウサギ抗血清をそれぞれ 800-900 μ l 加え、抗体画分をレジンに吸着させた。カラムを 9 ml の PBS で洗浄し挟雑物を除去後、0.1 M グリシン塩酸バッファー(pH 3.3)を 1 ml ずつ加えることにより、IgG 溶出画分を得た。溶出に際し、各画分に 10 μ l の中和緩衝液 (1 M Tris) を随時加え、溶液を中和した。溶出画分中に含まれる抗体濃度を 280 nm の吸光度を測定することで決定し(吸光係数: $1.34 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{(cm)}^{-1}$ として算出)、いくつかの画分をまとめ NAP25 カラムを用いて 50 mM 炭酸水素ナトリウム液に置換した。その結果、それぞれのペプチド抗血清より 5-15 mg の抗体が得られた (このポリクローナル抗体を、以下それぞれ、311-48 抗体、311-114 抗体、311-148 抗体、311-170 抗体、311-180 抗体、311-210 抗体と称す)。

(2) 抗 OST311IgG のビオチン化

上述 6 種類の抗 OST311 ペプチドポリクローナル抗体すべてについて 50 mM 炭酸水素ナトリウム液で 1 mg/ml に希釈した後、それぞれ 1 mg の抗体と、10 μ l のジメチルホルムアミドに溶解した Biotin-AC5-Osu(日本国、同仁化学)溶液 (1.82 μ g/ml)とを、4℃において 2 時間、転倒混和した。その後、混合液を NAP10 カラムに供し、未反応の Biotin-AC5-Osu を除くとともに、溶媒を PBS に置換し、6 種類のビオチン化抗 OST311 ペプチドポリクローナル抗体を得た。

(3) 抗 OST ペプチドウサギポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による OST311 発現細胞培養上清中の OST311 の検出

6種類の固相化用抗 OST311 ペプチドポリクローナル抗体に対して上述の6種類のビオチン化抗体を検出用として組み合わせることで、サンドイッチ ELISA システムを構築し、OST311 発現細胞培養上清中の OST311 蛋白質の検出を検討した。

上述の Protein A 精製により得られた固相化用抗 OST311 ペプチドポリクローナル抗体 6 種を 50 mM 炭酸水素ナトリウム液で 10 μ g/ml となるよう希釈し、96 穴 ELISA 用プレート Maxisorp(米国、Nunc 社)に 1 ウェルあたり 50 μ l 加え、37°C で 1 時間静置することで、IgG を固相化した。その後、反応液を除去し、Superblock blocking buffer in TBS (米国、PIERCE 社)を 1 ウェルあたり 50 μ l 加え室温で 10 分間ブロッキングした。溶液を除去した後、実施例 19 の(5)で記載した OST311RQH peak rapid 培養上清、または対照として MEM α 培地を 1 ウェルあたり 50 μ l ずつ加え、室温で 1 時間静置することで固相化抗体と結合させた。抗体反応後、TTBS で 3 回洗浄した後、10 % Blockace(日本国、大日本製薬社)を含む TTBS で 10 μ g/ml に希釈した上述のビオチン化抗 OST311 抗体 6 種 (311-48、311-114、311-148、311-170、311-180、311-210) をそれぞれ 1 ウェルあたり 50 μ l 加え、室温で 30 分間静置し二次抗体反応をおこなった。各ウェルを TTBS で 3 回洗浄した後、10 % Blockace を含む TTBS で 10,000 倍に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン(デンマーク、DAKO 社)を 1 ウェルあたり 50 μ l 加え、室温で 30 分間静置してビオチン化抗体と結合させた。各ウェルを TTBS で 3 回洗浄した後、ペルオキダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO 社)を 1 ウェルあたり 50 μ l 加え、室温で 5 分間発色させた後、0.5 M 硫酸液を 1 ウェルあたり 50 μ l 加えることにより反応を停止させた。測定は 96 穴プレート用の吸光度測定装置 MTP-300 (日本国、コロナ電気社)を用いて行い、450 nm の吸光度を 570 nm の吸光度で除した値を求めた。対照として MEM α のみを加えた場合の 450 nm/570 nm 値は全て 0.02 以下であった。一方、図 21 の A に示すとおり、311-48 抗体を固相化し、311-180 抗体で検出する組み合わせ、または、311-180 抗体で固相化し 311-148 抗体で検出する組み合わせでは、対照に比し有意に培養上清中の OST311RQH を検出することができた。また、例えば 311-48 抗体を固相化し、311-148 抗体で検出する組み合わせを用い

た場合は、両抗体の抗原部位が OST311 蛋白質の実施例 9 に記載した切断後の N 末側部分ペプチド(配列番号 6)に含まれるため、全長ポリペプチドを検出できるのみならず、その N 末部分ポリペプチド断片も検出できると予想される。一方、311-210 抗体を固相化し 311-180 抗体で検出すると、全長のみならず実施例 9 に記載した切断後の C 末側部分ペプチド(配列番号 8)を検出できると予想される。したがって、これらの組み合わせを複合的に用いることにより、生体試料等の検体中の OST311 全長ポリペプチドと部分ポリペプチドの絶対量の測定と存在比の識別が可能となる。

(4)抗 OST311 ペプチドウサギポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による組換え OST311 蛋白質濃度の定量

上述の ELISA システムについて、固相化抗体として 311-48 抗体または 311-180 抗体を、検出用抗体として 311-148 抗体を用いた組み合わせで、1、0.67、0.33、0.1、0.067、0.033 および 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の希釈系列からなる精製組換え OST311H の検出を検討した。その結果、図 21 の B に示すように、0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内で良好な一次回帰直線が得られたことから (311-48: $R^2=0.990$, 311-180: $R^2=0.996$)、少なくともこの濃度範囲における組換え OST311H を検出可能であることが判明した。

実施例 24 組換え OST311 蛋白質の単回投与による影響の検討

CHO 産生型組換え OST311H 全長蛋白質の正常マウス(BALB/c, 雄, 6 週齢)への短期作用を検討するため、精製した組換え OST311H 全長蛋白質を尾静脈内へ 1 匹当たり 5.0 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ ずつ単回投与した。対照群へは、溶媒(PBS)を 0.1 ml ずつ尾静脈内へ投与した。投与後 1、3、8 時間目で心採血、解剖を実施し、血清リン酸、カルシウム、ビタミン D 濃度の測定、腎臓近位尿細管上ナトリウム・リン酸共役輸送体の発現量を解析した。OST311 投与群および対照群はそれぞれ 6 匹のマウスから構成され、水道水および 1.03%の無機リン酸および 1.18%のカルシウムを含んだ固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

(1) 血清リン酸濃度の経時変化

表 8 に示すとおり、OST311 蛋白質を単回投与後、1、3 時間目における血清リン酸濃度には有意な差は認められなかったのに対し、投与後 8 時間では有意な低下を認めた。この結果から、OST311 の作用による血清リン酸濃度の低下には、3 から 8 時間を要することが明らかとなった。一方、すべての時間において血清カルシウム濃度には変化を認めなかった。

表 8 血清リン酸濃度

時間	1	3	8
媒体投与群 (mg/dL)	9.82±0.61	9.99±0.20	9.55±0.29
OST311 投与群 (mg/dL)	9.61±0.51	9.96±0.39	7.82±0.27
t-test	p > 0.5	p > 0.5	p < 0.005

(2) 腎臓近位尿細管上ナトリウム・リン酸共役輸送体の発現

実施例 11 の(6)に記載した方法に則り、投与後 1、3、8 時間目における腎臓を各群毎に混合し、近位尿細管冊子縁膜(BBM)を調整した。得られた BBM 中のナトリウム・リン酸共役輸送体(NaPi7)蛋白質の存在比をウェスタンブロッティング法により解析した。図 22 の A に示すとおり、投与後 1、3 時間目における NaPi7 の発現量は媒体投与群と同等であったのに対し、投与後 8 時間目における OST311 投与群の NaPi7 は、媒体投与群のそれに比し有意に低下していることが明らかとなった。一方、この NaPi7 蛋白質の減少が、RNA の転写調節を伴ったものかを検討するため、実施例 11 の(7)に手順に則り、個々のマウスより摘出した腎臓よりトータル RNA を調整し、同記載のプロープを用いてノザンブロッティングを実施した。その結果、図 22 の B に示すとおり、投与後 1、3 時間目における NaPi7 の mRNA 量は媒体投与群と同等であったのに対し、投与後 8 時間目における OST311 投与群の NaPi7 は、媒体投与群のそれに比し有意に低下していることが明らかとなった。以上の結果より、組換え OST311 蛋白質の直接又は間接作用による血清リン酸濃度の低下と、腎臓近位尿細管上ナトリウム・リン酸共役輸送体の下方修正は、両者の変動時間において相関しており、さらにこの蛋白質レベルでの下方修正に寄与する少なくとも一つの要因として、NaPi-7 の mRNA 転写レベルでの抑制が起こっていることが明らかとなった。

(3) 血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度の経時変化

投与後 1, 3, 8 時間目における血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度を、実施例 16 の(1)に記載した方法で測定した。図 23 に示したとおり、OST311 投与群において、投与後 3 時間で既に血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度の有意な低下を認め、8 時間目にはさらなる減少を認めた。

(4) ビタミン D 代謝酵素遺伝子群の発現変化

血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度低下が、腎臓に発現する 25-ヒドロキシビタミン D-1- α -水酸化酵素(1 α OHase)、あるいは 25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素(24OHase)遺伝子の変動に起因するかを解明するため、投与後 1, 3, 8 時間目における腎臓より、実施例 11(7)に記載した手順に則りトータル RNA を調製し、同記載のプロープを用いてノザンプロットングを実施した。図 24 に示したとおり、投与 1 時間後において既に 1 α OHase 遺伝子の mRNA 量減少および 24OHase 遺伝子の mRNA 量増加を認め、その傾向は投与後 8 時間においてより顕著なものとなることが明らかとなった。図 24 において、「vehicle」は 20mM リン酸緩衝液(pH6.7)および 0.3M NaCl からなる組換え OST311 蛋白質の溶媒を意味する。

これらの結果から、OST311 は腎臓に発現する 25-ヒドロキシビタミン D-1 α -水酸化酵素(1 α OHase)あるいは、25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素(24OHase)遺伝子の発現を調節することで、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度を低下させることが判明した。

実施例 25 OST311C 未欠失体の活性検討

(1) OST311C 未欠失体発現系の構築

以下のプライマーを合成した。

OST311R693 ATGCGGCCGCTATCGACCGCCCCTGACCACCCC (配列番号 53)

OST311R633 ATGCGGCCGCTACGGGAGCTCCTGTGAACAGGA (配列番号

54)

OST311R618 ATGCGGCCGCTCAACAGGAGGCCGGGGCCGGGGT (配列
番号55)

OST311R603 ATGCGGCCGCTCACGGGGTCATCCGGGCCCCGGGG (配列
番号56)

OST311R693, OST311R633, OST311R618, OST311R603 は OST311 の 3'末端からそれぞれ 20, 40, 45, 50 アミノ酸残基を欠失させ終止コドンおよび *NoI* 認識配列を導入する逆方向プライマーである。これらの逆方向プライマーと、実施例 19 に記載した OST311 の開始メチオニンおよび *EcoRI* 認識配列を含む順方向プライマー OST311ME1(配列番号 45)とを終濃度 0.2 μ M となるよう組み合わせ、Pyrobest DNA ポリメラーゼ (日本国、宝酒造社) を用い、実施例 19 の(2)で記載した OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 プラスミド DNA 100 ng を鋳型として、94℃、1 分保温した後、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分からなる工程を 1 サイクルとして 25 サイクルからなる PCR 反応を実施した。得られた反応生成物をフェノール/クロロホルム処理し、除蛋白、エタノール沈殿を行った後、*EcoRI*、*NoI* で消化し、2%アガロースゲル電気泳動によって各 DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国、Bio101) を用いて回収した。得られた DNA 断片を *EcoRI*、*NoI* で消化した pEAK8 ベクター(米国、エッジパイオシステム)と連結することによって pPKOST311- Δ C20、- Δ C40、- Δ C45、- Δ C50 プラスミドを得た。定法に従ってプラスミド DNA を調製後、ABI3700 蛍光 DNA シークエンサー (米国、PE アプライドバイオシステムズ社) によって塩基配列を決定し、OST311RQH 遺伝子の 3'末端から目的通りの塩基対が欠失していることを確認した。

(2) CHO 安定発現細胞の取得

トランスフェクタム(米国、プロメガ社)を用い、添付文書にしたがって、CHO ras clone1 細胞に pPKOST311- Δ C20、- Δ C40、- Δ C45、- Δ C50 プラスミド DNA をそれぞれ導入し、5 μ g/ml ピューロマイシン、10%FSC を含む MEM α 培地にて薬剤耐性を示す CHO-OST311RQ- Δ C20、- Δ C40、- Δ C45、- Δ C50 細胞を取得した。これらの細胞をそれぞれ 24 穴プレートに蒔き、5 μ g/ml ピューロマイシン、10%

FSC を含む MEM α 培地にてコンフルエントになるまで培養した後、無血清 DF (DMEM/F-12) 培地に置換し 3 日後、上清を回収した。得られた培養上清を、実施例 22 で記載した OST311 特異的ポリクローナル抗体 311-148 または 311-180 を用いたウェスタンブロッティング法に供し、予想される分子量に相当する位置における目的蛋白質の発現を確認した。

(3) OST311C 末欠失体発現 CHO 細胞移植試験

上述の 20、40、45 および 50 残基欠失体を発現する CHO 細胞を、実施例 13 に記載した方法と同様にヌードマウス(6 週齢、BALB/c-nude、雄、各群 6 匹ずつ)へ皮下移植した。対照群として全長 OST311RQH を発現する CHO 細胞および CHO ras clone-1 細胞をそれぞれ皮下移植した(n=6)。各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水および固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

細胞移植後 3 日目において心採血を実施し、実施例 20 に記載した同様の方法で血清リン酸、カルシウム濃度および 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 濃度の測定を行った。図 25 に示すように、CHO-OST311RQ- Δ C20、- Δ C40、- Δ C45、- Δ C50 細胞移植群のいずれにおいても、全長を発現する細胞移植群と同等の有意な血清リン酸濃度低下を認めた(t-test, ** $p < 0.001$)。また、CHO-OST311RQ- Δ C40、- Δ C45、- Δ C50 細胞移植群における血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 濃度についても著明な低下を認めた(CHO-ras clone-1 移植群の平均血清濃度を 100%とした場合、全長: 3.1%、 Δ C40: 9.4%、 Δ C45: 10.0%、 Δ C50: 68.1%)。これらの結果から、OST311 蛋白質の C 末端より少なくとも 50 アミノ酸を欠失させても、血清リン酸濃度低下活性または血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D3 濃度低下活性は維持されることが明らかとなった。

実施例 26 OST311N 末欠失体の活性検討

(1) OST311N 末 9 アミノ酸欠末体発現系の構築

以下のオリゴ DNA を合成した。

OST311SGFW:

aattccaccATGTTGGGGGCCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCTTGTGCAGC

GTCTGCAGCATGAGCGTCCTgcatGC (配列番号 57)

OST311SGRV:

aattGCatgcAGGACGCTCATGCTGCAGACGCTGCACAAGGCACAGACCCAG
AGCCTGAGGCGGGCCCCCAACATggtgg (配列番号 58)

OST311SGFW は、OST311 の開始メチオニンから配列番号 2 の 24 番目 Ala までのアミノ酸残基で構成されるシグナルペプチド部分をコードする遺伝子配列からなるオリゴ DNA であり、その 5'末端に *EcoRI* 認識配列を含む。OST311SGRV は OST311SGFW の相補鎖であり、その 5'末端に *EcoRI* 認識配列を含む。また、OST311SGFW の 3'側および OST311SGRV の 5'側には、制限酵素 *SphI* の認識部位が導入してある。この *SphI* 認識部位の導入により、シグナルペプチド配列内の 23 番目 Arg が His へと置換される。上述のオリゴ DNA 同士を定法に従いアニーリングさせることで、両末端部に *EcoRI* 認識配列、およびシグナルペプチド内 23 番目アミノ酸残基に相当する位置に *SphI* 認識配列を含み、OST311 の開始メチオニンから始まる 1 残基改変されたシグナルペプチドの全長をコードする 2 本鎖 DNA 断片が得られる。この DNA 断片を、*EcoRI* 消化した pEAK8 ベクター(米国、エッジバイオシステム)に挿入し、同ベクター内に存在する EF1 プロモーターと上述の DNA 断片とが、順方向となっているプラスミド DNA を選択することで、プラスミド pPKFGSG とした。

次に以下のプライマーを合成した。

OST311dN9 ATATGCATGCCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCAC (配列番号 59)

OST311dN9 は、5'末端に *SphI* 認識部位を含み、配列番号 2 の 24 番目 Ala 残基の後に同 34 番目 Ser 残基以降のアミノ酸配列が続くように設計された順方向プライマーである。本プライマーと、*NotI* 認識配列を含み、C 末端部分にヒスチジン残基 6 個が付加した後、終始コドンとなるよう設計されたプライマー OST311HNt(実施例 19、配列番号 46) を逆方向プライマーとして組み合わせ、実施例 19 の(2)で記載した OST311RQH/IRES-EGFP/pEAK8 プラスミド DNA を鋳型として用い、実施例 25(1)に記載した要領で PCR 増幅を実施した。得られた PCR 産物を *SphI* および *NotI* で消化した後、同じく *SphI* および *NotI* で消化した上述

のプラスミドベクターpPKFGSG に定法に従い挿入した。得られたプラスミド OST311 Δ N9-pPKFGSG を、ABI3700 蛍光 DNA シークエンサー(米国、PE アプライドバイオシステムズ社)を用いて塩基配列を決定したところ、挿入された遺伝子配列は、OST311RQH 遺伝子の開始メチオニンから 24 番目 Ala までのシグナルペプチドを含み(ただし、23 番目 Arg は His へ置換)、続く 25 番目 Tyr から 33 番目 Gly までの 9 アミノ酸残基に相当する遺伝子配列のみを欠失し、34 番目 Ser からヒスチデントグを含む終始コドンまでの全配列をコードしていることを確認した。

(2) CHO 安定発現細胞の取得

トランスフェクタム(米国、プロメガ社)を用い、添付文書にしたがって、CHO ras clone1 細胞に OST311 Δ N9-pPKFGSG プラスミド DNA を導入し、5 μ g/ml ビューロマイシン、10%FSC を含む MEM α 培地にて薬剤耐性を示す CHO-OST311RQ- Δ N9 細胞を取得した。得られた細胞より実施例 25 に記載した要領で培養上清を回収し、実施例 22 で記載した OST311 特異的ポリクローナル抗体 311-148、または新たに配列番号 2 の 237 番目 Gly より 251 番目 Ile までの部分ポリペプチドをウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体 311-237 を用いたウェスタンブロッティング法により、予想される分子量に相当する位置における目的蛋白質の発現を確認した。このことから、配列番号 2 における 23 番目 Arg を His に改変した OST311 シグナルペプチドは適切に機能し OST311 組換え蛋白質を分泌させること、また少なくとも 25 番目 Tyr から 33 番目 Gly を欠いても、分泌後、培養上清中にある程度安定に組み換え蛋白質が存在しうることが判明した。

(3) OST311N 末 9 アミノ酸欠失体発現 CHO 細胞移植試験

上述の CHO-OST311RQ- Δ N9 細胞を、実施例 13 に記載した方法と同様にヌードマウス(8 週齢、BALB/c-nude、雄、各群 6 匹ずつ)へ皮下移植した。対照群として全長 OST311RQH を発現する CHO 細胞および CHO ras clone-1 細胞をそれぞれ同様に皮下移植した(n=6)。各群毎にマウスをプラスチックケージで飼育し、水道水および固形食 CE2(日本クレア社、日本国)を自由摂取させた。

細胞移植後4日目において、ガラス製キャピラリーを用いて眼窩採血を実施し、実施例 20 に記載した要領で血清中リン酸濃度を測定したところ、CHO-OST311RQ- Δ N9 細胞移植群において、全長組換え体発現細胞移植群と同等の有意な血清リン酸濃度低下を認めた(CHO-ras clone-1 群: 6.85 ± 0.12 mg/dL, CHO-OST311RQH 群: 3.91 ± 0.23 mg/dL ($p < 0.001$, 対 CHO-ras clone-1 群), CHO-OST311RQ- Δ N9 群: 4.33 ± 0.15 mg/dL ($p < 0.001$, 対 CHO-ras clone-1 群))。この結果から、少なくとも配列番号 2 の 25 番目 Tyr から 33 番目 Gly からなる 9 アミノ酸残基を欠いても OST311 の生理活性が損なわれるものではないことが判明した。

実施例 27 大腸菌産生型 OST311 組換え体の検討

(1) OST311 大腸菌発現ベクター OST311/pET3a の構築

以下のプライマーを合成した。

OST311N: TGTATCCCAATGCCTCCCCACTG (配列番号 60)

OST311Bm: ATGGATCCCTAGATGAAGTTGGCGAAGGG (配列番号 61)

実施例 19 において作製した OST311/pCAGGS プラスミドを鋳型とし、OST311N (配列番号 60) 及び OST311Bm (配列番号 61) をプライマーとして、pfu DNA ポリメラーゼ (米国、プロメガ社) を用いて PCR を行った。反応は、94℃、1 分保温したのち、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル実施した。反応終了後、フェノールクロロホルム処理により酵素を失活させた後、エタノール沈殿により DNA を回収した。この DNA を *Bam*HI で消化し、目的の OST311 cDNA 断片を 2%アガロースゲル電気泳動で分離したのち、ジーンクリーン II (米国、BIO101 社) を用いて回収した。一方、プラスミドベクター pET3a (米国、Novagen 社) を *Nde*I で消化し、Klenow 断片 (スイス、ロッシュ社) を用いて末端の平滑化を行った。さらにこれを *Bam*HI で消化した後、目的のプラスミド DNA 断片を 0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、ジーンクリーン II (米国、BIO101 社) を用いて回収した。この様にして得られた OST311 cDNA 断片とプラスミド pET3a 消化物を、DNA ライゲーションキットバージョン 2 (日本国、宝酒造) を用いて連結した。これを大腸菌 DH5

α に導入してクローン化し、プラスミドを抽出した。プラスミドの塩基配列を確認し、pET3aにOST311 cDNAが目的通りに挿入されていることを確認した。これをOST311/pET3aとした。

(2)OST311 大腸菌発現ベクターOST311/pET28 の構築

以下のプライマーを合成した。

OST311Nd : ATCATATGTATCCCAATGCCTCCCCACTG (配列番号 62)

OST311Not : ATGCGGCCGCTAGATGAACTTGGCGAAGGG (配列番号 63)

OST311/pET3a プラスミドを鋳型とし、OST311Nd (配列番号 62) 及び OST311Not (配列番号 63) をプライマーとして、LA Taq (日本国、宝酒造社) を用いてPCRを行った。反応は94℃で1分保温したのち、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとして35サイクル実施した。反応終了後、フェノールクロロホルム処理により酵素を失活させた。増幅したDNA断片をエタノール沈殿にて回収した。これをNdeIとNotIで消化したのち、目的のOST311 cDNA断片を2%アガロースゲル電気泳動で分離し、ジーンクリーン II (米国、BIO101社) を用いて回収した。一方、プラスミドベクターpET28 (米国、Novagen社) をNdeIとNotIで消化し、さらに牛小腸アルカリフォスファターゼ (日本国、宝酒造社) を用いて脱リン酸化を行った。これを0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、目的のプラスミド断片をジーンクリーン II (米国、BIO101社) を用いて回収した。このようにして得たOST311cDNA及びpET28プラスミド消化物をDNAライゲーションキットバージョン2 (日本国、宝酒造社) を用いて連結し、大腸菌DH5 α に導入してクローニングし、プラスミドを抽出した。プラスミドの塩基配列を確認し、N末端側にHis-tag配列を付加した組換え体OST311が発現するようなOST311 cDNAがpET28に挿入されていることを確認した。これをOST311/pET28とした。このベクターにコードされる組換え体His-OST311の塩基配列とアミノ酸配列を図26に示す。

(3)組換え体His-OST311の大腸菌での発現と調製

プラスミドOST311/pET28を大腸菌BL21(DE3) Codon Plus RP (米国、スト

ラタジーン社)に導入し、形質転換させたクローンを取得した。得られた大腸菌クローンを 10 mg のカナマイシン (米国、シグマ社) を含む 100 ml の LB 培地に植菌し 37℃ で終夜培養した。この菌体液を 1 L の LB 培地に $A_{600}=0.1$ となるように接種し、3 L 容量の坂口フラスコを用いて 37℃ で振とう培養をおこなった。経時的に培養液の吸光度を測定して $A_{600}=0.6\sim 1.0$ になったところで、イソプロピル-1-チオ- β -ガラクトシド (IPTG) (日本国、和光純薬) を 1 mM となるように加え、4 時間後に遠心分離 ($7700g \times 15$ 分) により集菌した。集めた菌体を 20 ml の 1 mM DTT を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 中に懸濁し、フレンチプレスを用いて菌体を破碎した。この破碎液を遠心分離 ($7700g \times 15$ 分) し、次に、沈殿画分を 15 ml の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) で懸濁し、DNase I (スイス国、ロッシュ社) を 0.1 mg/mL になるように添加して、4℃ で 1 時間振とうした。その後、遠心分離 ($23400g \times 15$ 分) を行い、沈殿画分をインクルージョンボディとして回収した。得られたインクルージョンボディーを 10 ml の 0.75 M 尿素および 1% Triton-X を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8) に懸濁し、遠心分離 ($23400g \times 15$ 分) により沈殿を回収する洗浄操作を実施した。さらに、この洗浄操作を 2 回繰り返した。

洗浄したインクルージョンボディーを 5 ml の変性剤溶液 (1 mM DTT および 6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH8)) に懸濁し、37℃ で 1 時間振とうすることにより可溶化した。不溶物を遠心分離 ($23400g \times 15$ 分) により沈殿として除去した後、6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH6) で平衡化した。この可溶化サンプルを、Ni-NTA Agarose (ドイツ国、QIAGEN 社) を充填したカラムに供し、6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH6) で洗浄した。カラムに吸着された蛋白質を 500 mM イミダゾール (日本国、ナカライテスク社) および 6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH4.5) にて溶出させて変性 His-OST311 を精製した。精製したサンプルの 280 nm における紫外吸光度から濃度を求め、最終濃度が 2 mg/ml となるように 6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH6) を加えて変性 His-OST311 溶液を調製した。このサンプルに最終濃度が 1 mM になるように還元剤システインを加え、0.6 M 塩酸グアニジン、0.1% Tween20 を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH6) で 100 倍希釈し、リ

フォールディングを開始し、4℃で3日間以上インキュベートした。

このリフォールディング溶液を、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.8) に対して 4℃で透析した。透析液を、限外濾過膜を用いて約 10 倍に濃縮し、陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社) を用いて HPLC にて精製した。蛋白質の溶出には 10%グリセロールを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH6) を用い、0.5 M から 2 M までの NaCl 直線濃度勾配で溶出させた。この溶出パターンを図 27 に示す。溶出された 2 種類の蛋白質ピークのうち、より低い塩濃度で溶出されたピークに His-OST311 が含まれていることが SDS-PAGE 分析および質量分析からわかった。このようにして約 1L の培養菌体から最終精製物である His-OST311 を約 0.6 mg 調製することができた。

(4)MK-OST311 発現ベクター pET22b-MK-OST311 の構築

以下のプライマーを合成した。

OST311MK1 : gaattcatatgaaatacccgaaacgcttccccgctgctgggctccagctg (配列番号 64)

OST311MK2 : cccaagcttgcgccgcctagatgaacttggc (配列番号 65)

上述の His-OST311 発現プラスミド OST311/pET28 を鋳型として、OST311MK1 (配列番号 64) と OST311MK2 (配列番号 65) をプライマーとして用いて PCR を行い目的の配列を増幅した。この操作により得られた OST311 cDNA は、開始コドン (ATG) の後に続く 27 塩基が大腸菌型のコドンに変換されている。この PCR 産物を QIAquick PCR purification Kit (ドイツ国、QIAGEN 社) で精製し、制限酵素 *Nde*I (日本国、宝酒造社) と *Not*I (日本国、宝酒造社) を用い 37℃、1 時間消化した。消化物を、アガロース電気泳動で分離後、QIAquick PCR purification Kit (ドイツ国、QIAGEN 社) で精製した。この DNA 断片を、制限酵素 *Nde*I と *Not*I で 37℃、1 時間消化し、アガロース電気泳動で分離精製したプラスミドベクター pET22b (米国、Novagen 社) に DNA Ligation kit Ver2 (日本国、宝酒造社) を用いて 16℃で 15 分間連結した。これを大腸菌 JM109 (日本国、宝酒造社) に導入してクローン化し、定法に従ってプラスミドを抽出した。得られたプラスミドの塩基配列を決定し、目的通りに取得した OST311 cDNA が

pET22b ベクターに挿入されていることを確認した。これを pET22-MK-OST311 とした。このベクターにコードされる組換え体 MK-OST311 の塩基配列とアミノ酸配列を図 26 に示す。

(5)MK-OST311 の大腸菌での発現と調製

プラスミド pET22-MK-OST311 を大腸菌 BL21(DE3) Codon Plus RP (米国、ストラタジーン社) に導入し、形質転換させたクローンを取得した。得られた大腸菌クローンを 10 mg のアンピシリンを含む 100 ml の LB 培地に植菌し 37℃ で終夜培養した。この菌体液を 1 L の LB 培地に $A_{600}=0.1$ となるように接種し、3L 容量の坂口フラスコを用いて 37℃ で振とう培養をおこなった。この菌体液に IPTG を添加することで組換え体の発現を誘導し、上述の His-OST311 調製法と同様の方法でインクルージョンボディを調製した。

洗浄したインクルージョンボディを 5 ml の変性剤溶液 (1 mM DTT および 6 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH8)) に懸濁し、37℃ で 1 時間振とうすることにより可溶化した。これを変性剤溶液で 2 倍に希釈し、さらに、0.6 M 塩酸グアニジンおよび 0.1% Tween20 を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH6) を用いて 100 倍に希釈し、リフォールディングを開始し、4℃ で 3 日間以上インキュベートした。酸化剤の添加および pH7 以上の条件下では、蛋白質の沈澱が生じ、リフォールディング効率が著しく低下することが明らかとなった。このリフォールディング溶液を、0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.8) に対して 4℃ で透析した。限外濾過膜を用いて透析液を約 10 倍に濃縮し、陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社) を用いて HPLC にて精製した。蛋白質の溶出には 10% グリセロールを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH6) を用い、0.5 M から 2 M までの NaCl 直線濃度勾配で溶出させた。図 28 に示すように蛋白質の溶出ピークは 2 種類あり、より低い塩濃度で溶出されたピークに MK-OST311 が含まれていることが、SDS-PAGE 分析および質量分析から明らかとなった。約 1 L のフラスコ培養菌体から最終精製物である MK-OST311 を約 0.6 mg 精製することができた。

(6)MK-OST311 の PEG 化

イオン交換カラムで精製した10 mlのMK-OST311 (0.05 mg/ml)を10%酢酸を用いてpH4.8に調整した。この溶液に10 mM 酢酸緩衝液 (pH4.8)に溶解した分子量20000の活性化PEG (米国、Sharewater社) 25 mgを氷中で攪拌しながら加えた。15分後に10 mM酢酸緩衝液 (pH4.8)に溶解した1 M水素化シアノほう素ナトリウム (日本国、ナカライテスク社)を最終濃度15 mMになるように加え、さらに4℃で16時間攪拌した。この反応でPEG化したOST311を陽イオン交換カラム SP-5PW (日本国、東ソー社)を用いてHPLCにて精製した。蛋白質の溶出には10%グリセロールを含む20 mMリン酸緩衝液 (pH6)を用い、0.5 Mから2 MまでのNaCl直線濃度勾配で溶出させた。PEG化されたMK-OST311は、図29に示すように、MK-OST311よりもさらに低イオン強度側において単一なピークとして溶出された。

(7)His-OST311 組換え体の活性検討

精製 His-OST311 組換え体の生物活性を検討するため、実施例 24 に記載した要領で組み換え蛋白質を正常マウス(5 週齢、BALB/c、雄、各群 6 匹)に一匹当たり 4.5 μ g/0.1 ml ずつ尾静脈内単回投与し、9 時間後の血清リン酸および 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度を実施例 20 に記載した同様の方法で測定した。また陽性対照として、同用量の CHO-OST311H 細胞由来精製組換え体を、また媒体群へは 20 mM リン酸緩衝液(pH6.9)および 0.3 M NaCl からなる溶媒を 0.1 ml ずつ尾静脈内単回投与した。

図 30 の A に示すように、投与から 9 時間後の His-OST311 投与群において、媒体投与群と比し有意な血清リン低下作用を認めた。また、その低下程度は CHO 由来組換え体投与群と同等であった。一方、投与から 9 時間後の血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度についても、図 32 に示すように His-OST311 投与群において顕著な低下を認めた。

実施例 24 の(3)および(4)に記載したように、CHO 細胞由来の OST311 蛋白質を単回投与して4時間後にすでに有意な血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度低下を認めており、それに先立ち、投与後 1 時間目において腎臓での 25-ヒドロキシビタミン D-1- α -水酸化酵素(1 α OHase)の発現低下および 25 ヒドロキシビタミ

ン D-24-水酸化酵素(24OHase)の発現亢進を認めている。そこで、BALB/c マウス(5週齢、雄)へ一匹当たり 4.5 μ g/0.1 ml ずつ His-OST311 を尾静脈内単回投与し、1 および 4 時間後に摘出した腎臓における 1α OHase 遺伝子および 24OHase 遺伝子の発現変化をノザンブロット法にて解析した。陽性対照として同用量の CHO-OST311H 細胞由来精製組換え体を、また媒体群へは 20 mM リン酸緩衝液(pH7.0)、0.3 M NaCl からなる溶媒を 0.1 ml ずつ尾静脈内単回投与した。図 31 に示すように、His-OST311 は CHO 由来組換え体と同様に、投与後 1 時間目ですでに 1α OHase 遺伝子の発現低下および 24OHase 遺伝子の発現亢進を引き起こしており、CHO 由来組換え体と同等のビタミン D 代謝酵素遺伝子発現調節活性を有していることが判明した。また、図 32 に示すように、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 濃度変化は、組換え体投与後 4 時間目で減少傾向を示し、8 時間目ではより顕著な低下を認めており、実施例 24 の(3)で示した CHO 由来組換え体投与試験で認められた経時変化の様態とほぼ一致していることが判明した。

以上の結果から、大腸菌で産生した組換え体 His-OST311 は、少なくとも血清リン低下活性ならびにビタミン D 代謝調節活性については、CHO-OST311H 細胞が産生する分泌型組換え体と同等の生物活性を有していることが判明した。

(8) PEG 化 MK-OST311 の活性検討

PEG 化 MK-OST311 の生物活性を、実施例 24 に記載した要領で正常マウス(5週齢、BALB/c、雄、各群 8 匹) 一匹当たり 5.0 μ g/0.1 ml ずつ尾静脈内単回投与し、9 時間後の血清リン酸濃度を実施例 20 に記載した同様の方法で測定した。媒体群へは 20 mM PB(pH6.0)、10% glycerol、1 M NaCl および 0.1% Tween20 からなる溶媒を 0.1 ml ずつ尾静脈内単回投与した。投与後 8 時間目において、ガラス製キャピラリーを用いて眼窩採血を施し、得られた血清中の無機リン酸濃度を測定した。図 30 の B に示したように、PEG 化 MK-OST311 投与群において、媒体投与群と比し有意な血清リン低下作用を認めた。この結果から、大腸菌産生型組換え体を PEG 化してもその生物活性は阻害されないことが判明した。

実施例 28 切断部分へのアミノ酸変異導入

実施例 9 に記載したように、OST311 は配列番号 2 のアミノ酸残基 179 番目の Arg と 180 番目の Ser の間で切断を受けることが判明している。一方、実施例 19 に記載したように OST311 のアミノ酸残基 176 番目の Arg およびアミノ酸残基 179 番目の Arg の両者を同時に Gln に置換することでこの切断が阻害されることが確認されている。これらの事実、この切断が隣接する RXXR もしくは RRXXR 配列からなるモチーフを認識するプロテアーゼによる可能性を示唆するものである。また、配列番号 4 に示すポリペプチドからなる全長型組換え体を生体内に投与した際にも、上述の、あるいはそれに類似した切断を受ける可能性が考えられる。そこで、配列番号 2 のアミノ酸残基 175 番目から 180 番目までの各残基をそれぞれ Ala、Gln あるいは Trp に置換することにより、CHO 細胞における各変異組換え体の発現分泌パターンにどのような影響を与えるかを検討した。

(1) 切断部分変異導入 OST311 遺伝子の作製

以下のプライマーを合成した。

pyh23PA1F AACACCCCCATAGCACGGCGGCACA (配列番号 66)
pyh23PA1R TGTGCCGCCGTGCTATGGGGGTGTT (配列番号 67)
pyh23RA1F ACCCCCATACCAGCGCGGCACACCCG (配列番号 68)
pyh23RA1R CGGGTGTGCCGCGCTGGTATGGGGGT (配列番号 69)
pyh23RA2F CCCATACCACGGGCGCACACCCGGAG (配列番号 70)
pyh23RA2R CTCCGGGTGTGCGCCCGTGGTATGGG (配列番号 71)
pyh23HA1F ATACCACGGCGGGCCACCCGGAGCGC (配列番号 72)
pyh23HA1R GCGCTCCGGGTGGCCCGCCGTGGTAT (配列番号 73)
pyh23TA1F CCACGGCGGCACGCCCGGAGCGCCG (配列番号 74)
pyh23TA1R CGGCGCTCCGGGCGTGCCGCCGTGG (配列番号 75)
pyh23RA3F CGGCGGCACACCGCGAGCGCCGAGGA (配列番号 76)
pyh23RA3R TCCTCGGCGCTCGCGGTGTGCCGCCG (配列番号 77)
pyh23SA1F CGGCACACCCGGGCCCGAGGACGA (配列番号 78)
pyh23SA1R TCGTCCTCGGCGGCCCGGTGTGCCG (配列番号 79)
pyh23RKQ1F ACCCCCATACCACAGCGGCACACCCG (配列番号 80)

pyh23RKQ1R CGGGTGTGCCGCTGTGGTATGGGGGT (配列番号 81)
pyh23RKQ2F CCCATACACGGCAGCACACCCGGAG (配列番号 82)
pyh23RKQ2R CTCCGGGTGTGCTGCCGTGGTATGGG (配列番号 83)
pyh23RKQ3F CGGCGGCACACCCAGAGCGCCGAGGA (配列番号 84)
pyh23RKQ3R TCCTCGGCGCTCTGGGTGTGCCGCCG (配列番号 85)
pyh23RWF CGGCGGCACACCTGGAGCGCCGAGG (配列番号 86)
pyh23RWR CCTCGGCGCTCCAGGTGTGCCGCCG (配列番号 87)

pyh23PA1F および pyh23PA1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 652 番目のシトシンをグアニンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 174 番目の Pro を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を P174A と称す。

pyh23RA1F および pyh23RA1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 655 番目のシトシンをグアニンに、656 番目のグアニンをシトシンにそれぞれ置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 175 番目の Arg を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R175A と称す。

pyh23RA2F および pyh23RA2R は、OST311 cDNA(配列番号 1)の 658 番目のシトシンをグアニンに、659 番目のグアニンをシトシンにそれぞれ置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 176 番目の Arg を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R176A と称す。

pyh23HA1F および pyh23HA1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 661 番目のシトシンをグアニンに、662 番目のアデニンをシトシンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 177 番目の His を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を H177A と称す。

pyh23TA1F および pyh23TA1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 664 番目のア

デニンをグアニンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 178 番目の Thr を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を T178A と称す。

pyh23RA3F および pyh23RA3R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 667 番目のシトシンをグアニンに、668 番目のグアニンをシトシンにそれぞれ置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 179 番目の Arg を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R179A と称す。

pyh23SA1F および pyh23SA1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 670 番目のアデニンをグアニンに、671 番目のグアニンをシトシンにそれぞれ置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 180 番目の Ser を Ala に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を S180A と称す。

pyh23RKQ1F および pyh23RKQ1R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 656 番目のグアニンをアデニンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 175 番目の Arg を Gln に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R175Q と称す。

pyh23RKQ2F および pyh23RKQ2R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 659 番目のグアニンをアデニンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 176 番目の Arg を Gln に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R176Q と称す。

pyh23RKQ3F および pyh23RKQ3R は、OST311cDNA(配列番号 1)の 668 番目のグアニンをアデニンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 179 番目の Arg を Gln に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R179Q と称す。

pyh23RWF および pyh23RWR は、OST311cDNA(配列番号 1)の 667 番目のシトシンをチミンに置換することで、配列番号 2 に示すアミノ酸残基 179 番目の Arg を Trp に置換する為の変異導入用の順方向、逆方向のプライマーである。以下、本変異を R179W と称す。

(1)-1 OST311P174AH 遺伝子の作製

Pyrobest DNA ポリメラーゼ（日本国、宝酒造社）を用い、添付文書に従って 2 種類の反応液を 100 μ L 調製した。一方にはプライマーとして OST311ME1(配列番号 45)、pyh23PA1F(配列番号 66)を終濃度 0.2 μ M で使用し、もう一方にはプライマーとして pyh23PA1R(配列番号 67)、OST311HNt(配列番号 46)を終濃度 0.2 μ M で使用した。それぞれの反応液に、実施例 19 の(1)に記載した OST311/pCAGGS プラスミド 10 ng を鋳型として加え、94℃で 1 分保温したのち、94℃で 20 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR 反応を実施した。これら 2 種類の反応液をそれぞれ 10 倍に希釈し、それぞれ 1 μ L を Pyrobest DNA ポリメラーゼ(日本国、宝酒造社)添付文書に従って調製した反応液 100 μ L に添加した。この溶液にプライマーとして OST311 ME1(配列番号 45)、OST311HNt(配列番号 46)を終濃度 0.2 μ M となるよう加え、94℃で 1 分保温したのち、94℃で 20 秒、55℃で 30 秒、72℃で 1 分 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルの PCR 反応を実施し、さらに 72℃で 7 分保温した。得られた反応生成物をジーンクリーン II（米国、Bio101 社）を用いて添付の文書に従い回収した。その後 *Eco*RI、*Not*I で消化し、2%アガロースゲル電気泳動によって約 800 bp の DNA 断片を分離、ジーンクリーン II（米国、Bio101 社）を用いて回収した。得られた DNA 断片を pEAK8 ベクター（米国 エッジバイオ社）の *Eco*RI、*Not*I 部位に挿入することによって、プラスミド OST311P174AH-pEAK8 を得た。定法に従ってプラスミド DNA を調製し、ABI3700 蛍光 DNA シークエンサー（米国、PE アプライドシステムズ社）によって塩基配列を決定し、目的の P174H の変異が導入されたことを確認した。また C 末端にヒスチンタグが付加されていることを確認した。P174A の変異が導入された変異遺伝子でコードされるポリペプチドを OST311P174AH と称す。

(1)-2 OST311R175AH 遺伝子の作製

pyh23RA1F(配列番号 68)、pyh23RA1R(配列番号 69)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-3 OST311R176AH 遺伝子の作製

pyh23RA2F(配列番号 70)、pyh23RA2R(配列番号 71)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-4 OST311H177AH 遺伝子の作製

pyh23HA1F(配列番号 72)、pyh23HA1R(配列番号 73)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-5 OST311T178AH 遺伝子の作製

pyh23TA1F(配列番号 74)、pyh23TA1R(配列番号 75)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-6 OST311R179AH 遺伝子の作製

pyh23RA3F(配列番号 76)、pyh23RA3R(配列番号 77)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-7 OST311S180AH 遺伝子の作製

pyh23SA1F(配列番号 78)、pyh23SA1R(配列番号 79)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-8 OST311R175QH 遺伝子の作製

pyh23RKQ1F(配列番号 80)、pyh23RKQ1R(配列番号 81)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-9 OST311R176QH 遺伝子の作製

pyh23RKQ2F(配列番号 82)、pyh23RKQ2R(配列番号 83)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-10 OST311R179QH 遺伝子の作製

pyh23RKQ3F(配列番号 84)、pyh23RKQ3R(配列番号 85)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(1)-11 OST311R179WH 遺伝子の作製

pyh23RWF(配列番号 86)、pyh23RWR(配列番号 87)プライマーを用いて(1)-1と同様の方法にて作製した。

(2) 切断部分変異導入 OST311 遺伝子の一過性発現と培養上清の調製

pEAK rapid 細胞 (米国、エッジバイオシステム) を 12 ウェルプレートに播種した。この細胞に pEAK システム添付文書 (米国、エッジバイオシステム社) に従い、上述の 11 種類の変異 OST311 発現プラスミドをリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした。4 時間静置したのち、1.5 ml の血清を含まない MEM α 培地に置換した後、2 日間、37℃にて培養してその上清を回収した。

(3) 切断部分変異導入 OST311 遺伝子の発現確認

得られた培養上清を、実施例 6 の(3)に記載した要領でウエスタンブロッティングに供し、培養上清中の切断部分変異導入 OST311 組換え体の存在を検討した。検出抗体には、実施例 22 で記載した OST311 特異的ポリクローナル抗体 311-148 を用いた。その結果、図 33 に示すように、アミノ酸残基 174 番目から 180 番目までの置換体の内、P174A、R175A、R175Q、H177A、T178A および S180A の変異を導入した OST311 組換え体において、16 kDa 付近に野生型と同様の、配列番号 6 に示すポリペプチドを含む分解産物を認めたが、R176A、R179A、R176Q、R179Q あるいは R179W の変異を導入した OST311 組換え体において、いずれも分解産物を認めないことが明らかとなった。これらの結果から、アミノ酸残基 179 番目 Arg と

180 番目 Ser との間で起こる切断には、アミノ酸残基 176 番目 Arg および 179 番目 Arg が特に重要な役割を果たすことが示唆された。即ち、両残基を少なくとも Ala, Gln あるいは Trp のいずれのアミノ酸で置換しても、切断が阻害もしくは抑制を受けることから、全長ポリペプチドの産生を促進することが期待される。

実施例 29

実施例 6 に示すように OST311 を CHO 細胞や COS 細胞で発現させた場合に得られる組換え体産物は、実施例 9 で示したように RXXR モチーフの直後である 179 番目のアルギニンと 180 番目のセリンの間で切断されるものが得られる。実施例 18 で示したように、OST311 蛋白質の低リン血症誘導活性はこの部位の切断を受けなかった全長蛋白において保持されていることが明らかとなった。さらに、RXXR モチーフがこの切断に関与していることは、実施例 19 および実施例 28 に示した変異導入試験で明らかである。組換え体 OST311 を効率良く生産取得する上において、この切断を回避することは重要な課題であり、実施例 28 で示した RXXR モチーフに変異を導入することは一つの有効な方法である。RXXR モチーフを認識する蛋白分解酵素の一つとして、*furin* が知られている。この酵素は、トランスゴルジ領域に局在し蛋白質が合成された後、分泌に至る過程において RXXR モチーフを認識して蛋白質を切断すると考えられている。

(1)OST311 切断への *furin* の関与

furin が欠損している LoVo 細胞に OST311/pCAGGS プラスミドをトランスフェクタム（米国、プロメガ社）を用いて導入し、48 時間培養したのち、一過性に発現し、培養液中に分泌した OST311 蛋白質をウェスタンブロッティングで 311-148 抗体を用いて解析したところ、切断断片は検出されなかった。このことから、OST311 の生産時に見られる切断に *furin* が関与していることが示唆された。

(2)OST311 の切断の回避

上記結果より、*furin* 活性を阻害することが 179 番目のアルギニンと 180 番目

のセリンの間で切断されない OST311 の生産性向上に有効であることが想定された。したがって、Lovo 細胞のような furin 活性を持たない宿主で OST311 を発現させること、あるいは furin の阻害剤を添加することにより furin 活性を抑制した状況で OST311 を発現させることが考えられる。そこで、CHO-OST311H 細胞の furin 活性を抑制する目的で、 α 1-アンチトリプシンボートランド (α 1-PDX) を Benjannet S らが報告している方法 (J Biol Chem 272:26210-8, 1997) に準じて一過性に発現させて培養上清を回収したところ、組換え体産物中の全長体の存在比率が、対照とした非遺伝子導入 CHO-OST311H 細胞上清中のものに比べて増加していた。このことから、furin 活性を抑制する物質を外来的あるいは内因的に作用させることで OST311 の全長蛋白の生産効率を上昇させることができると考えられた。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明により、リン酸代謝、カルシウム代謝および/又は石灰化を調節するポリペプチド、同ポリペプチドをコードする DNA、同ポリペプチドを有効成分とする医薬組成物、および同ポリペプチドを認識する抗体と同抗体を有効成分とする医薬組成物、同抗体を用いた診断方法と診断用組成物が提供される。

配列表フリーテキスト

配列番号 12 : 合成 DNA

配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

配列番号 15 : 合成 DNA

配列番号 16 : 合成 DNA

配列番号 17 : 合成 DNA

配列番号 18 : 合成 DNA

配列番号 19 : 合成 DNA
配列番号 20 : 合成 DNA
配列番号 21 : 合成 DNA
配列番号 22 : 合成 DNA
配列番号 23 : 合成 DNA
配列番号 24 : 合成 DNA
配列番号 25 : 合成 DNA
配列番号 26 : 合成 DNA
配列番号 27 : 合成 DNA
配列番号 28 : 合成ペプチド
配列番号 29 : 合成ペプチド
配列番号 30 : 合成 DNA
配列番号 31 : 合成 DNA
配列番号 32 : 合成 DNA
配列番号 33 : 合成 DNA
配列番号 34 : 合成 DNA
配列番号 35 : 合成 DNA
配列番号 36 : 合成 DNA
配列番号 37 : 合成 DNA
配列番号 38 : 合成 DNA
配列番号 39 : 合成 DNA
配列番号 40 : 合成 DNA
配列番号 41 : 合成 DNA
配列番号 42 : 合成 DNA
配列番号 43 : 合成 DNA
配列番号 44 : 合成 DNA
配列番号 45 : 合成 DNA
配列番号 46 : 合成 DNA
配列番号 47 : 合成 DNA

配列番号 48 : 合成 DNA
配列番号 49 : 合成ペプチド
配列番号 50 : 合成ペプチド
配列番号 51 : 合成ペプチド
配列番号 52 : 合成ペプチド
配列番号 53 : 合成 DNA
配列番号 54 : 合成 DNA
配列番号 55 : 合成 DNA
配列番号 56 : 合成 DNA
配列番号 57 : 合成 DNA
配列番号 58 : 合成 DNA
配列番号 59 : 合成 DNA
配列番号 60 : 合成 DNA
配列番号 61 : 合成 DNA
配列番号 62 : 合成 DNA
配列番号 63 : 合成 DNA
配列番号 64 : 合成 DNA
配列番号 65 : 合成 DNA
配列番号 66 : 合成 DNA
配列番号 67 : 合成 DNA
配列番号 78 : 合成 DNA
配列番号 69 : 合成 DNA
配列番号 70 : 合成 DNA
配列番号 71 : 合成 DNA
配列番号 72 : 合成 DNA
配列番号 73 : 合成 DNA
配列番号 74 : 合成 DNA
配列番号 75 : 合成 DNA
配列番号 76 : 合成 DNA

配列番号 77 : 合成 DNA

配列番号 78 : 合成 DNA

配列番号 79 : 合成 DNA

配列番号 80 : 合成 DNA

配列番号 81 : 合成 DNA

配列番号 82 : 合成 DNA

配列番号 83 : 合成 DNA

配列番号 84 : 合成 DNA

配列番号 85 : 合成 DNA

配列番号 86 : 合成 DNA

配列番号 87 : 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. 以下の(a)、(b)、(c) 又は(d)のポリペプチドをコードする DNA。
 - (a) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (b) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチド
 - (c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド
 - (d) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、
 - (i) 前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含み、
 - (ii) 当該部分配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、
 - (iii) 低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有する、前記ポリペプチド
2. 以下の(e)又は(f)の DNA を含む DNA。
 - (e) 配列番号 1 に示される塩基配列のうち第 133 番目～第 885 番目の塩基配列若しくは配列番号 3 に示される塩基配列のうち第 1 番目～第 681 番目の塩基配列からなる DNA
 - (f) 配列番号 1 若しくは 3 に示される塩基配列の全部若しくは一部の配列からなる DNA から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチドをコードする DNA

3. 請求項 1 又は 2 に記載の DNA を含む組換えベクター。
4. 請求項 3 に記載の組換えベクターを含む形質転換体。
5. 以下の(a)、(b)、(c) 又は(d)のポリペプチド。
 - (a) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (b) 配列番号 2 若しくは 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有するポリペプチド
 - (c) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド
 - (d) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドであって、前記部分配列が、
 - (i) 前記アミノ酸配列のうち少なくとも第 34 番目～第 201 番目のアミノ酸配列を含み、
 - (ii) 当該部分配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、
 - (iii) 低リン酸血症誘導活性、リン酸輸送抑制活性、石灰化抑制活性若しくは生体内ビタミン D 代謝調節活性を有する、前記ポリペプチド
6. ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ (N-ビニル-ピロリドン)、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシドとポリエチレンオキシドとのコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール及びポリビニルアルコールからなる群から選択される少なくとも 1 つによって修飾された、請求項 5 に記載のポリペプチド。
7. 請求項 5 又は 6 に記載のポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物。
8. 請求項 5 又は 6 に記載のポリペプチドを有効成分として含み、生体のカルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミン D 代謝を調節し得る医薬組成物。

9. 請求項 5 又は 6 に記載のポリペプチドを有効成分として含み、高リン血症、副甲状腺機能亢進症、腎性骨異栄養症、異所性石灰化、骨粗鬆症及び高ビタミン D 血症からなる群から選ばれる少なくとも 1 つに有効な医薬組成物。
10. 請求項 5 若しくは 6 に記載のポリペプチド又はこれらの部分断片と反応する抗体。
11. 請求項 5 若しくは 6 に記載のポリペプチド又はその部分断片を抗原として動物に免疫する工程を含む、請求項 10 に記載の抗体の製造方法。
12. 請求項 10 に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。
13. 請求項 10 に記載の抗体を有効成分として含み、生体のカルシウム代謝、リン酸代謝、石灰化又はビタミン D 代謝を調節し得る医薬組成物。
14. 請求項 10 に記載の抗体を有効成分として含み、骨疾患に有効な医薬組成物。
15. 骨疾患が、骨粗鬆症、ビタミン D 抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病及び腫瘍性骨軟化症からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 14 に記載の医薬組成物。
16. 請求項 10 に記載の抗体を含む、カルシウム代謝異常、リン酸代謝異常、石灰化異常及びビタミン D 代謝異常のうち少なくとも 1 つの異常を呈する疾患の診断剤。
17. 疾患が、腎不全、腎性リン酸漏出症、尿細管性アシドーシス及びファンconi 症候群からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 16 に記載の診断剤。
18. 請求項 10 に記載の抗体を含む、骨疾患の診断剤。
19. 骨疾患が、骨粗鬆症、ビタミン D 抵抗性くる病、腎性骨異栄養症、透析骨症、低石灰化骨症、パジェット病及び腫瘍性骨軟化症からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 18 に記載の診断剤。
20. 配列番号 11 に示す塩基配列を有する DNA 又はその部分断片を含む、カルシウム代謝異常、リン酸代謝異常及び石灰化異常のうち少なくとも 1 つの異常を呈する疾患の診断剤。
21. 部分断片が、配列番号 11 に示す塩基配列のうち第 498 番から第 12966

番までの配列を有するものである請求項 20 に記載の診断剤。

22. 疾患が、常染色体優性低リン酸血症性くる病である請求項 20 又は 21
に記載の診断剤。

図1

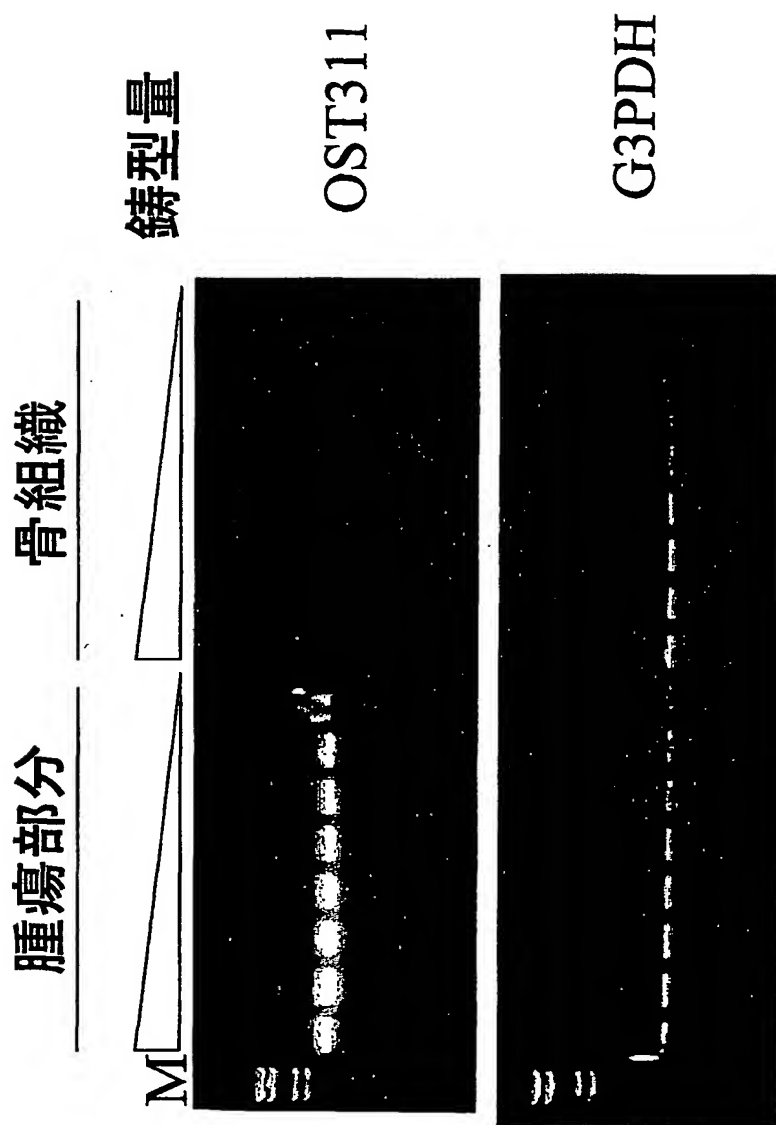
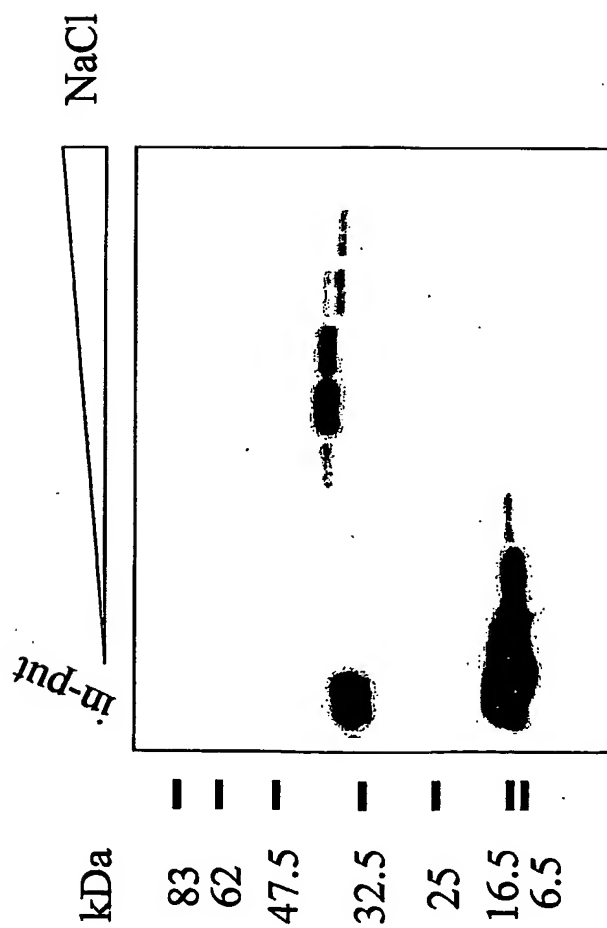
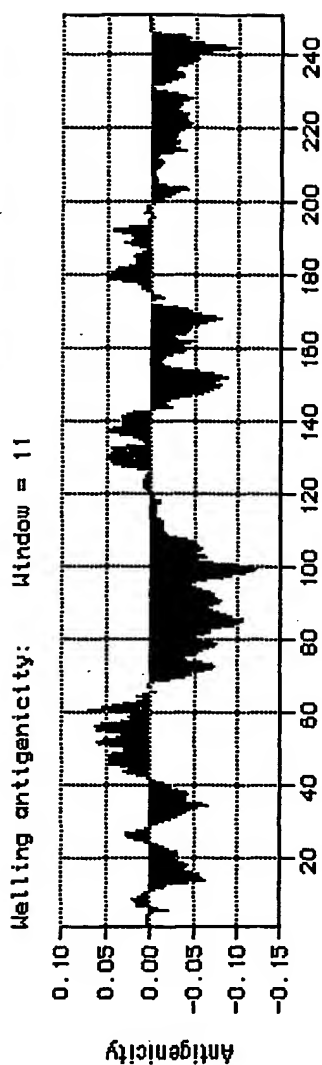
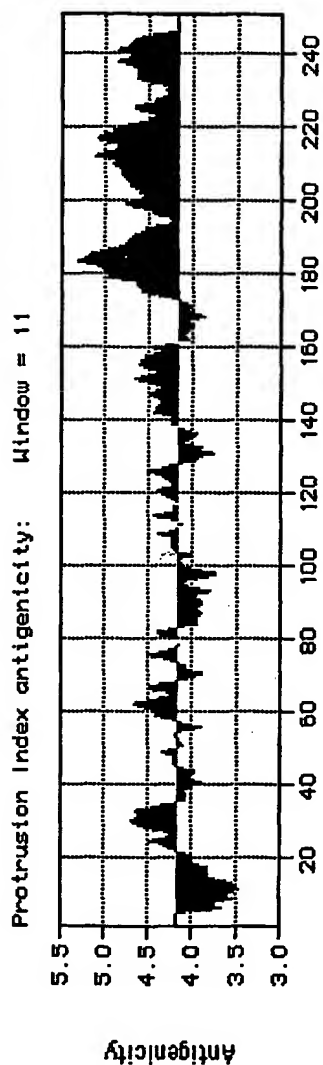
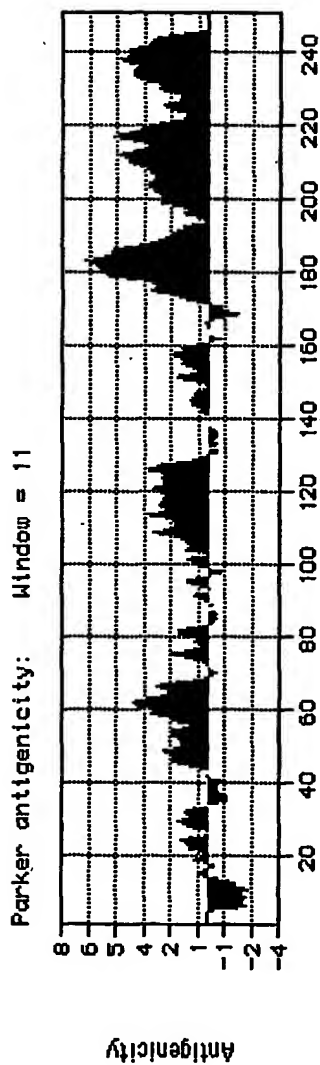


図2



3A



3B

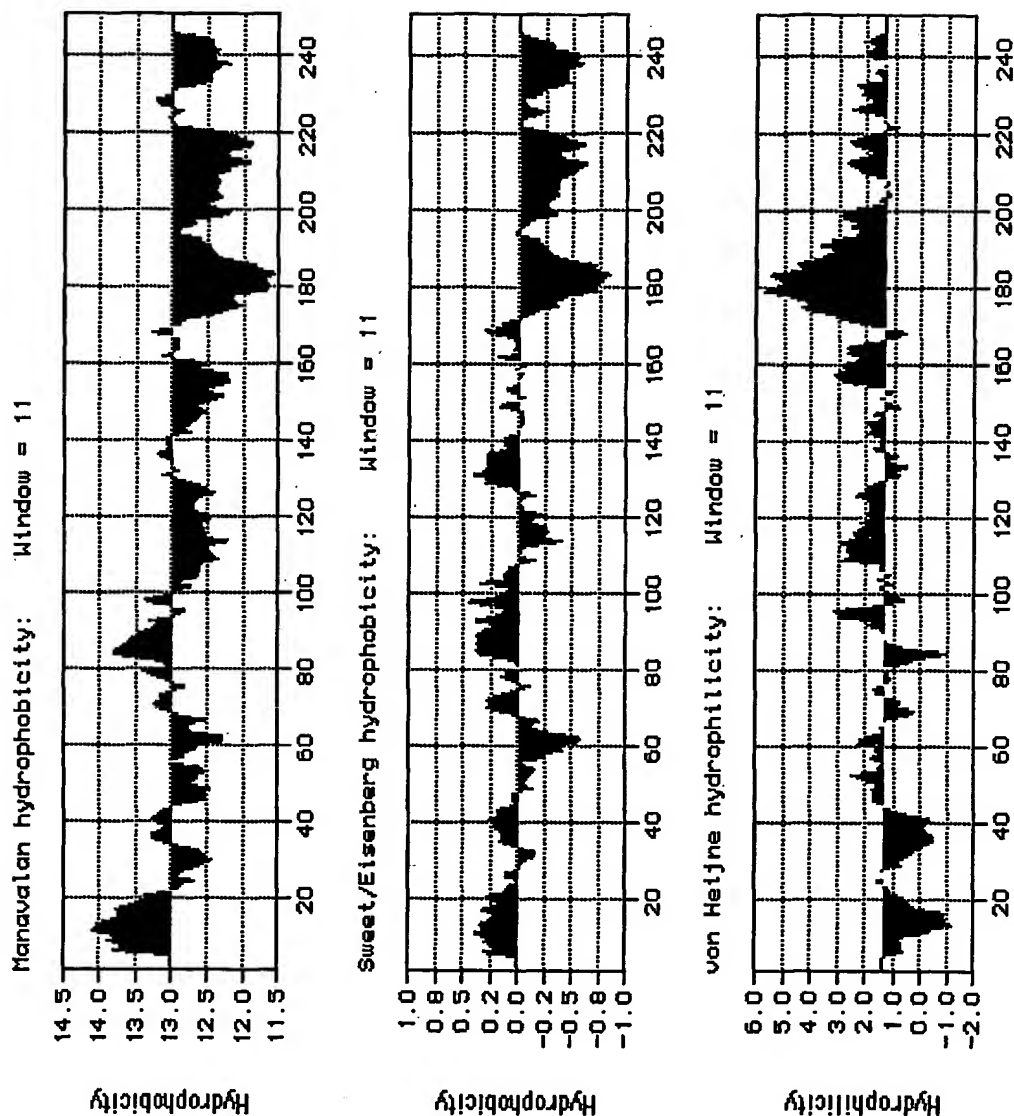
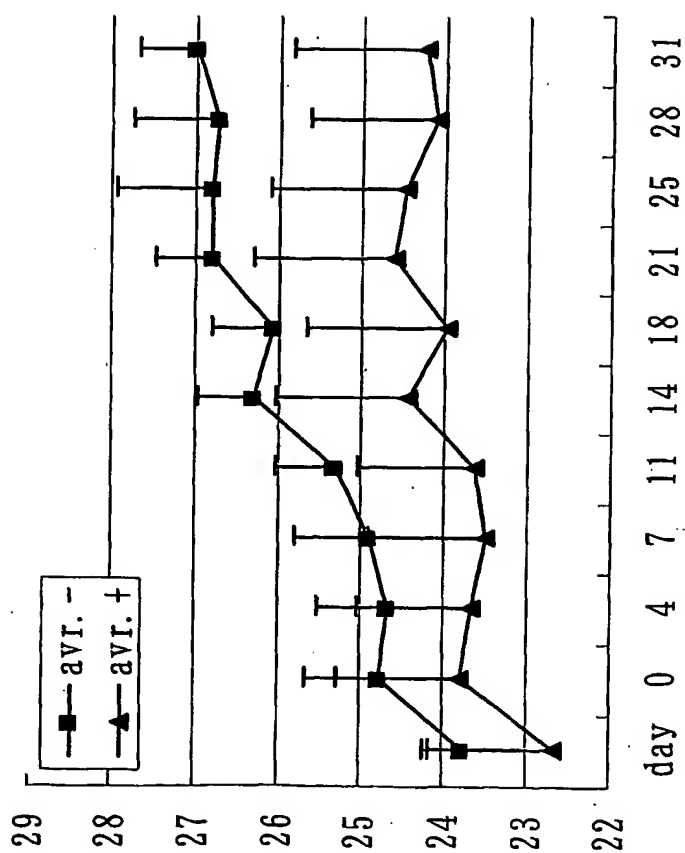


図4



差替え用紙 (規則26)

CHO-OST311H

CHO-OST190H

对照CHO ras clone-1

図5

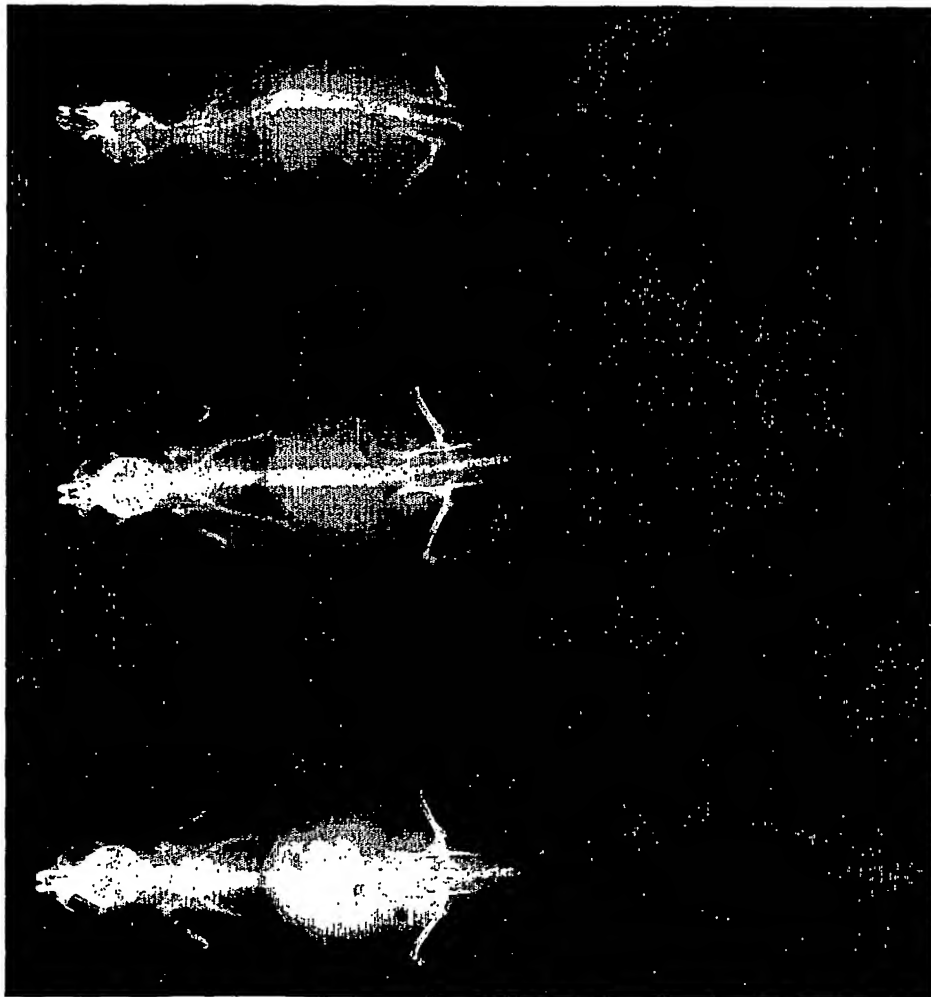


図6

hOST311:配列番号2の残基番号82番目~251番目のアミノ酸配列
 mOST311:配列番号10の残基番号1番目~180番目のアミノ酸配列

Match% 69.4

hOST311:	ALMIRSEDAGFVVITGVMRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRCRFQHQHQTLE	120-
mOST311:	ALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDLHGNIFGSLHFSPENCKFRQWLTLE	50-
	1-10-20-30-40-50-	
hOST311:	NGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPFPYSQFLSRNEIPLIHENT	170-
mOST311:	NGYDVYLSQKHHLVSLGRAKRIFQPGTNPPFPFSQFLARRNEVPLIHFT	100-
	60-70-80-90-100-	
hOST311:	PIPRRHTRSAEDDSDERDPLNVLPKPRARMTAPASCQELPSAEDNSPMAS	220-
mOST311:	VRPRRHTRSAEDPPERDPLNVLPKPRPRATPPVSCSRELPSAEEGGPAAS	150-
	110-120-130-140-150-	
hOST311:	DPLGVVRGGRVNTTHAGGTGPEGCRPEFAKFI	250-
mOST311:	DPLGVLRGRGDARGGAGGADRCRPFPRFV	180-
	160-170-180-	

図7A

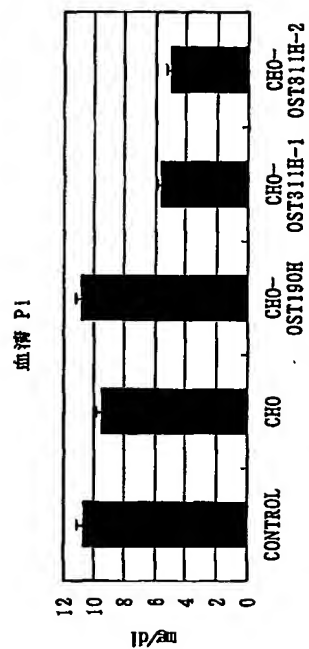


図7B

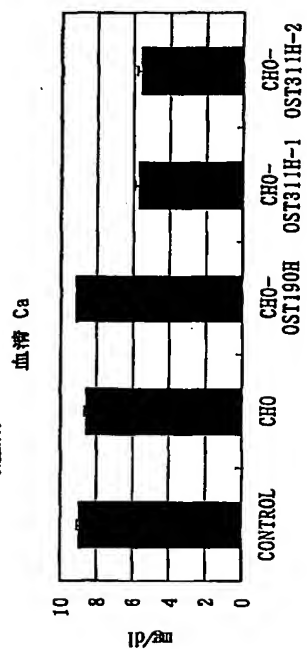


図7C

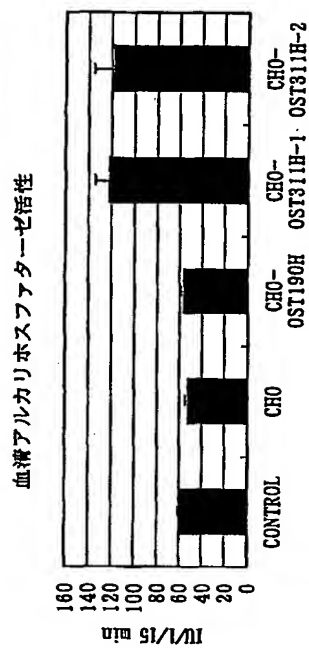


図8

ウェスタンブロッティング CBB染色

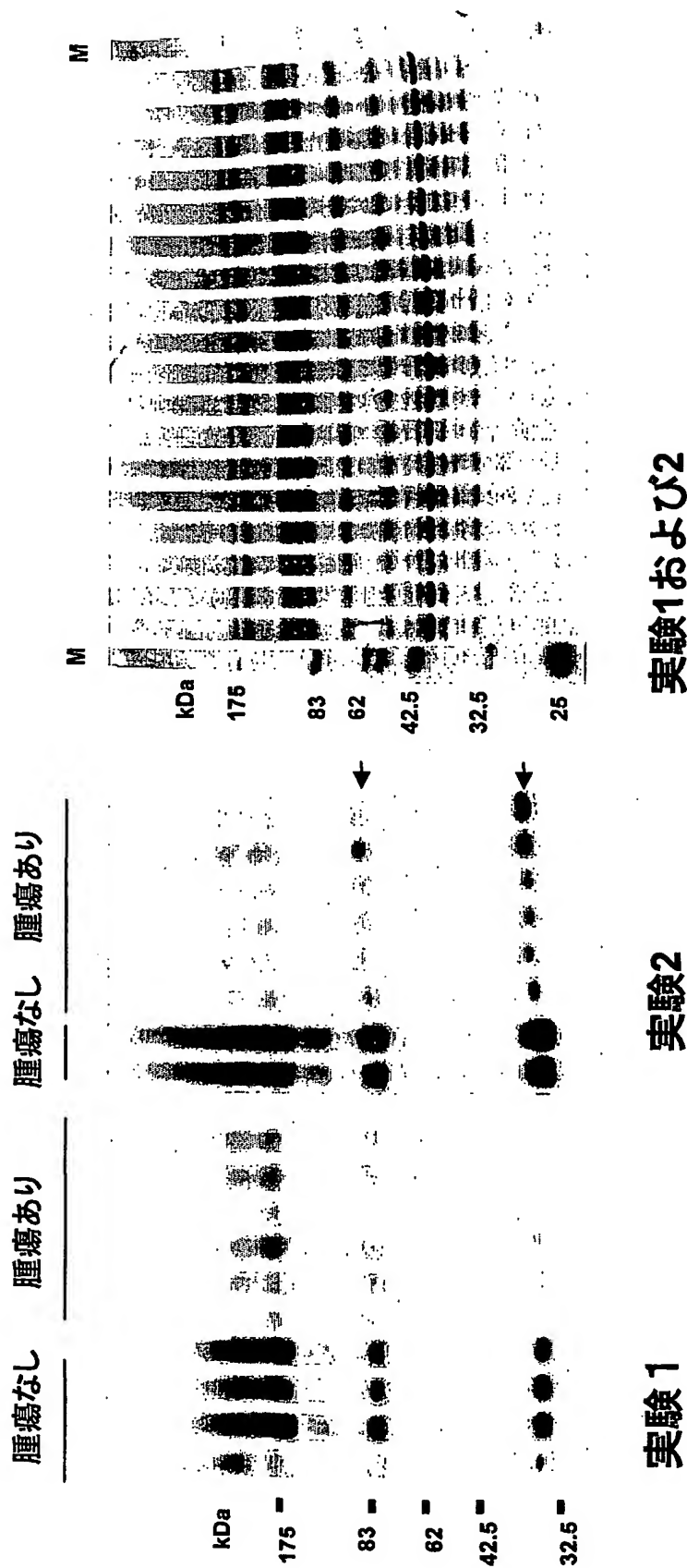


図9A

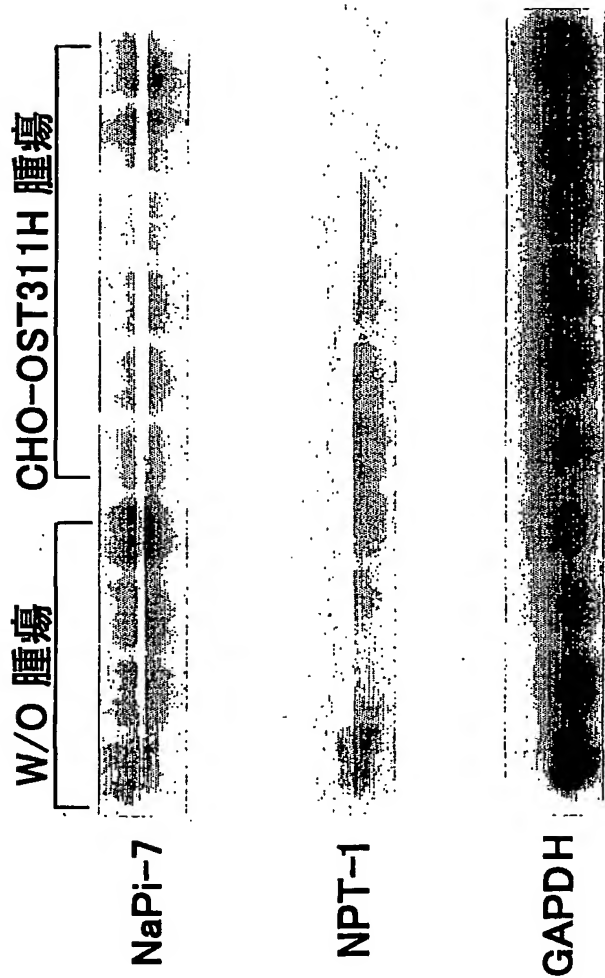


图 9B

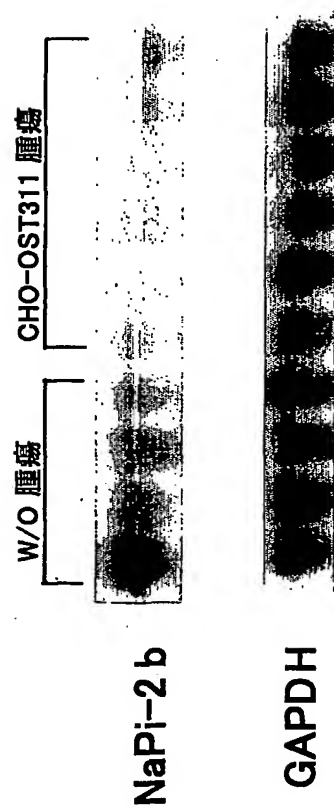


図9C

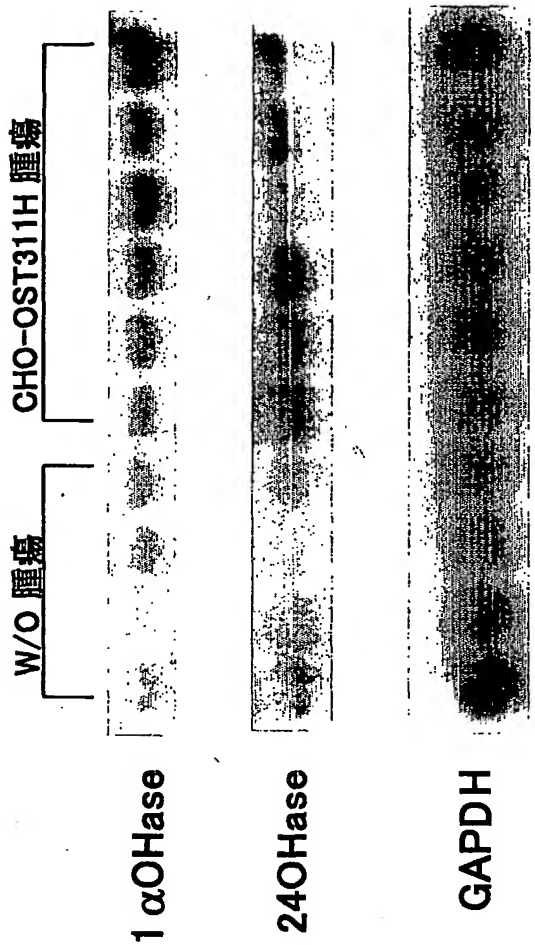


図10

腫瘍なし CHO OST190H OST311H

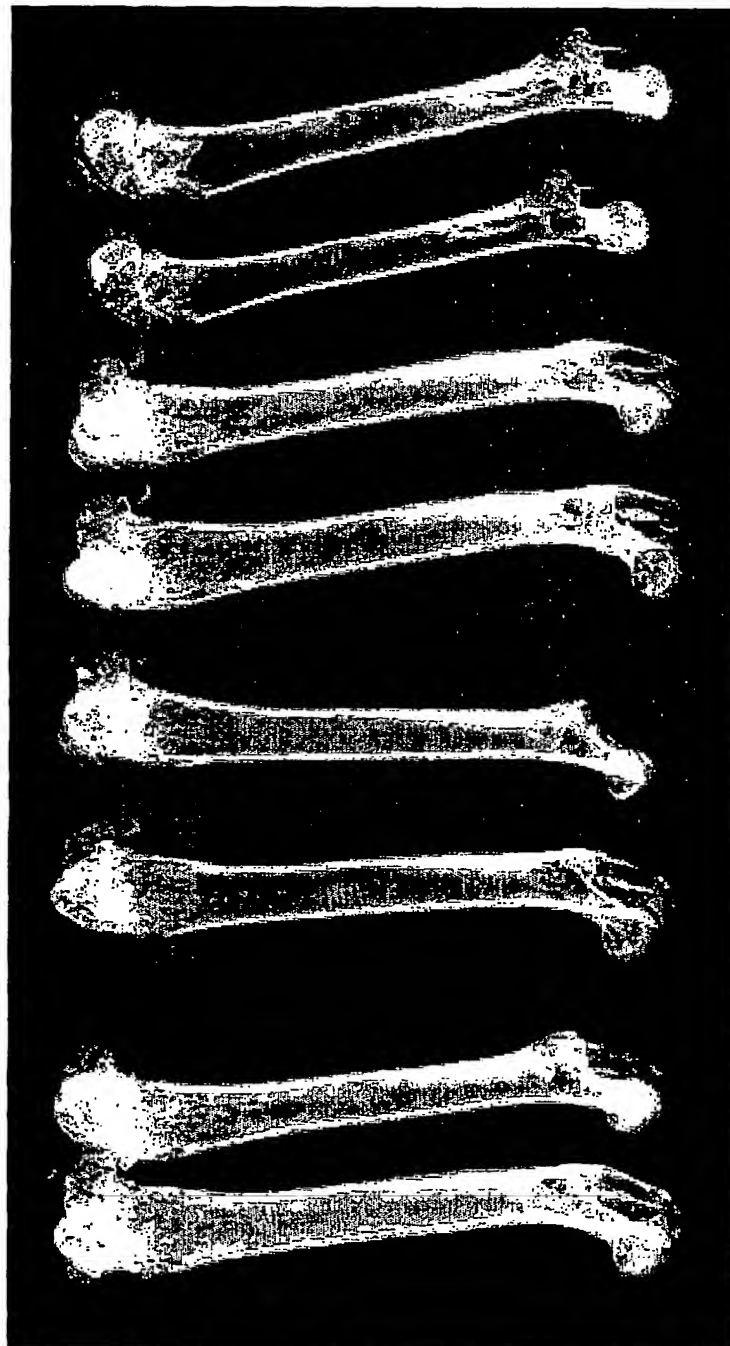


図11A

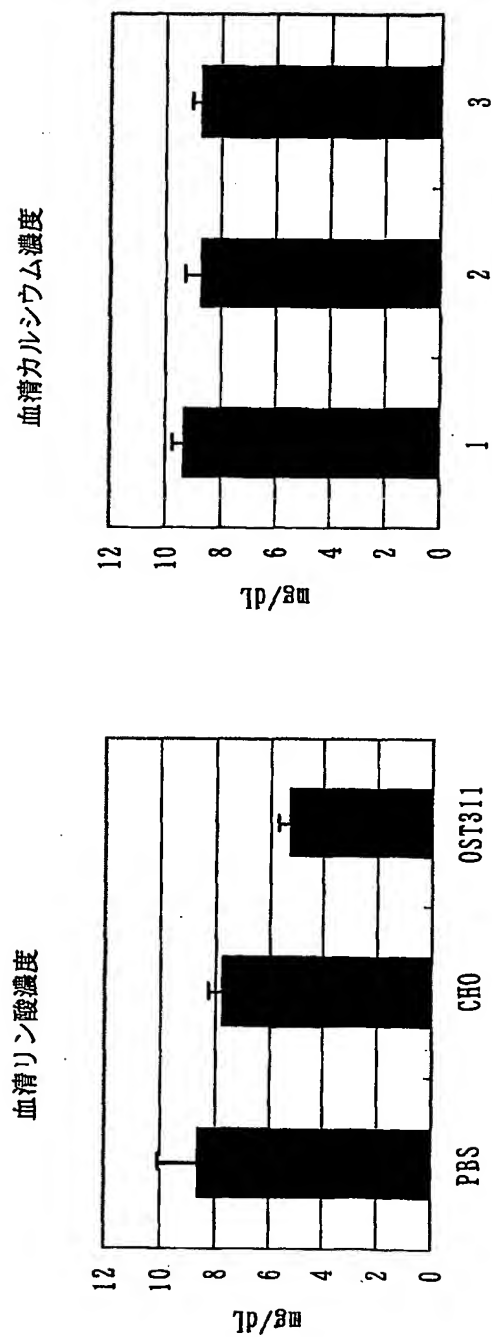


図11B

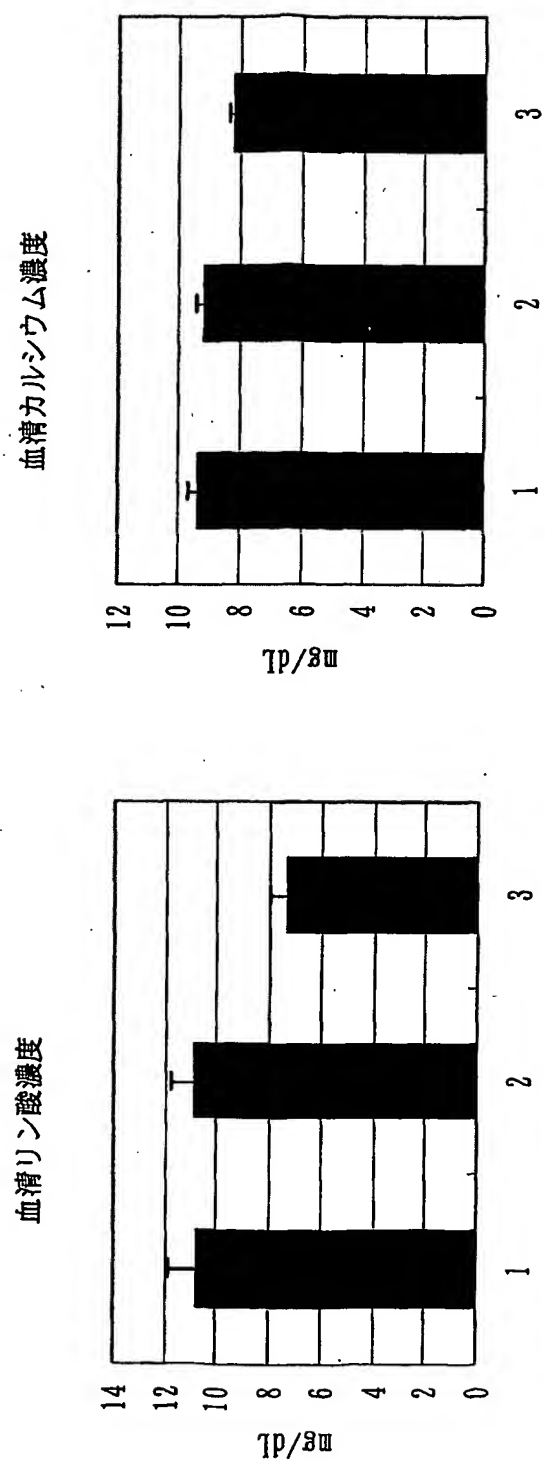
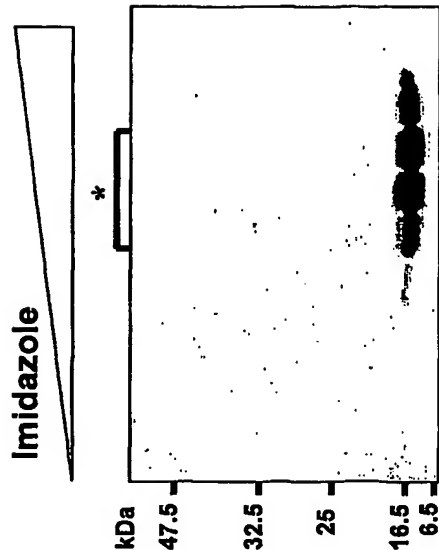


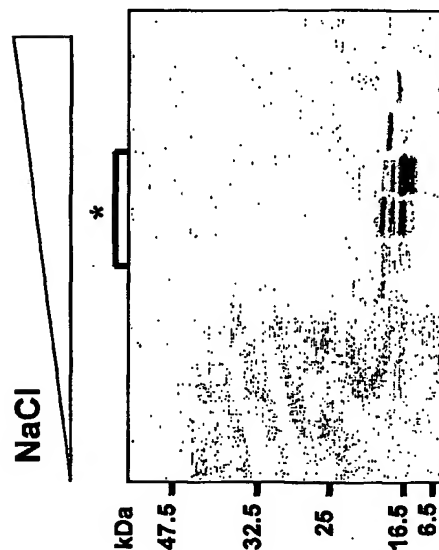
图12

OST311: 180 - 251



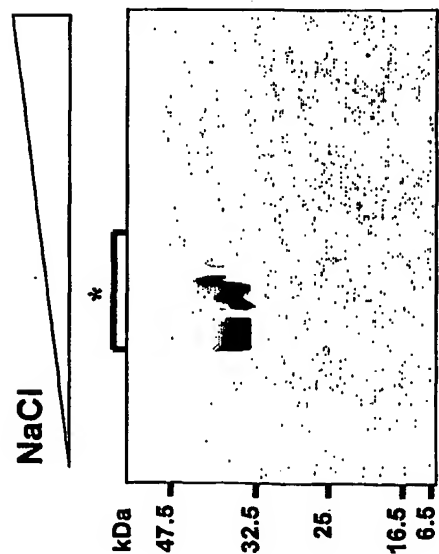
抗 His6抗体

OST311: 25 - 179



抗OST311抗体

OST311: 25 - 251



抗 His6抗体

図13

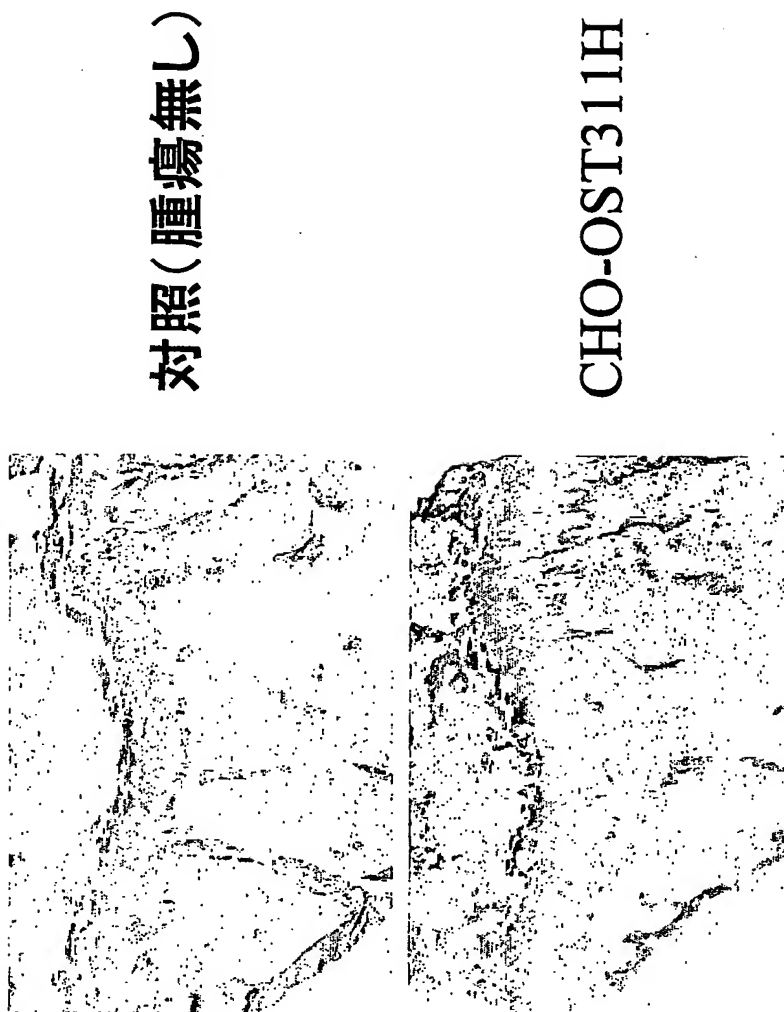
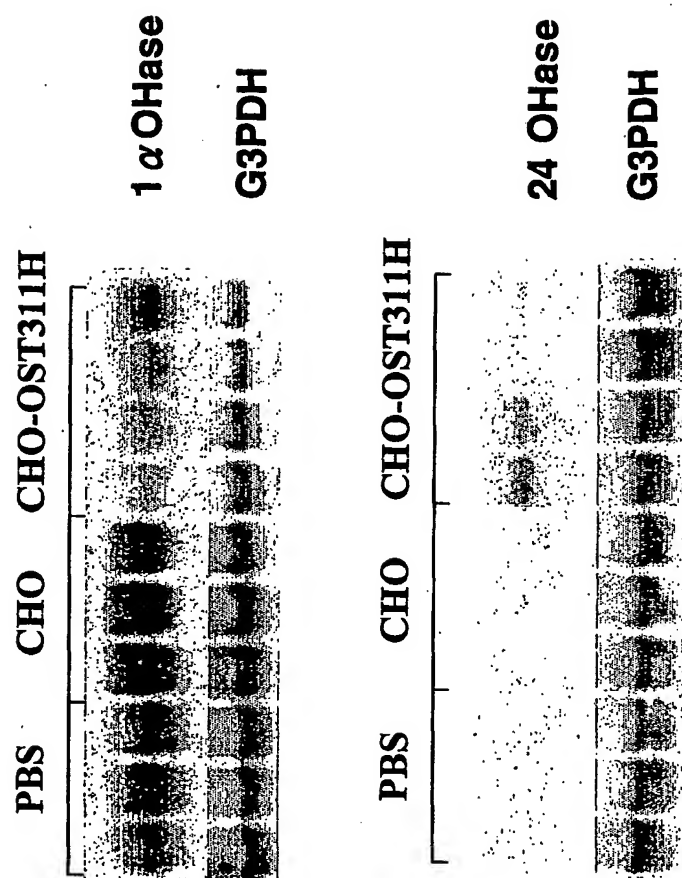


図14



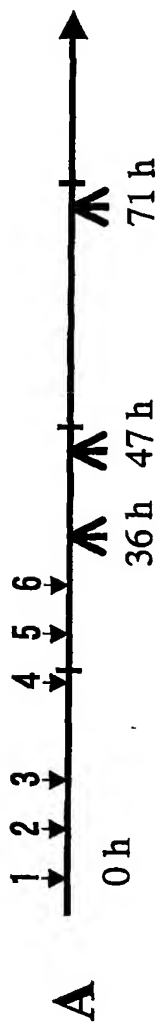
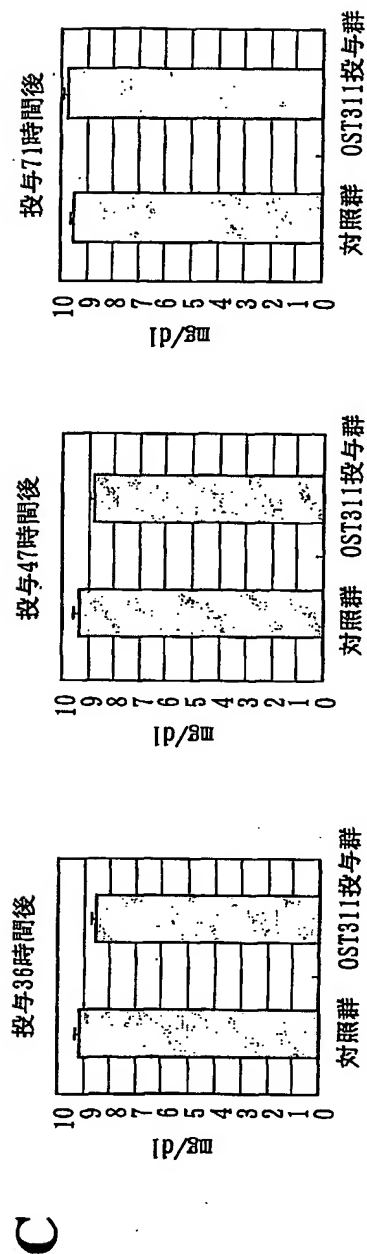
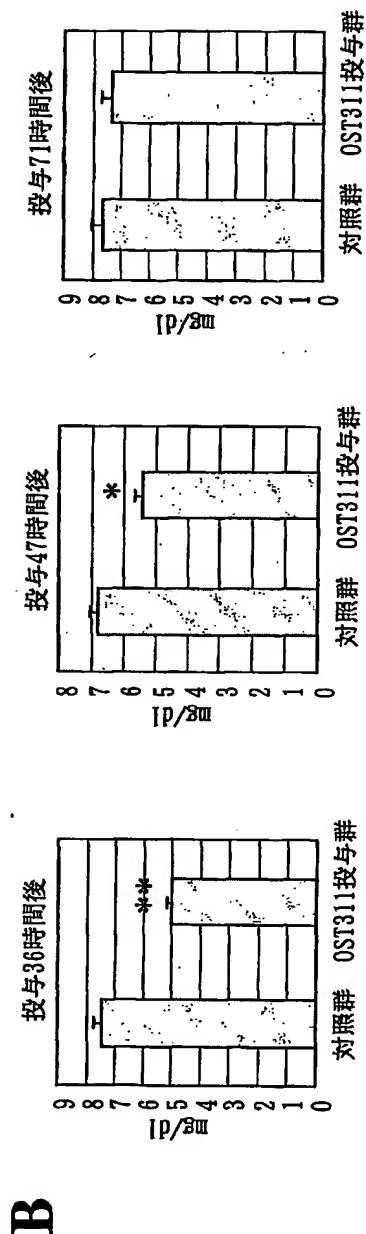


図15



C

図16

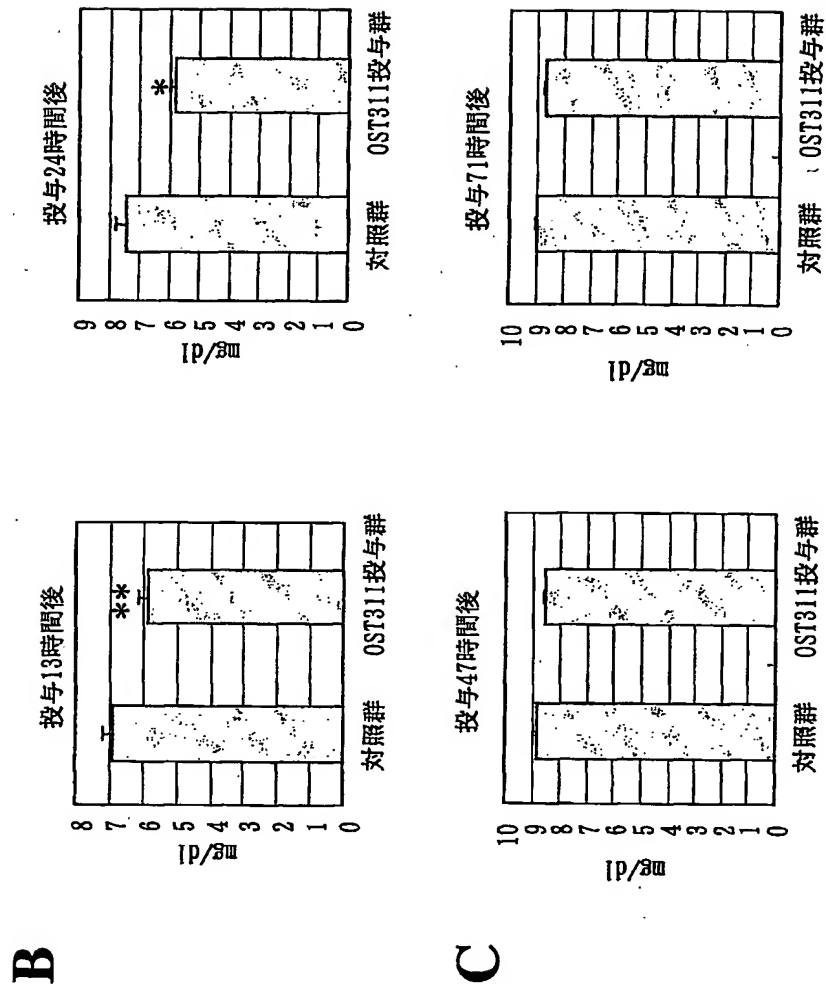
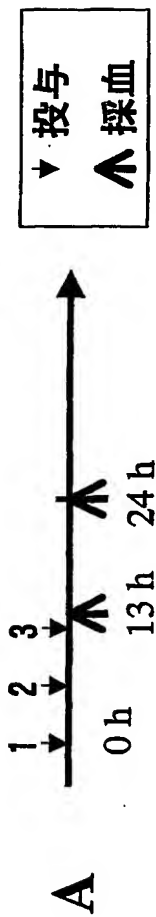


図17

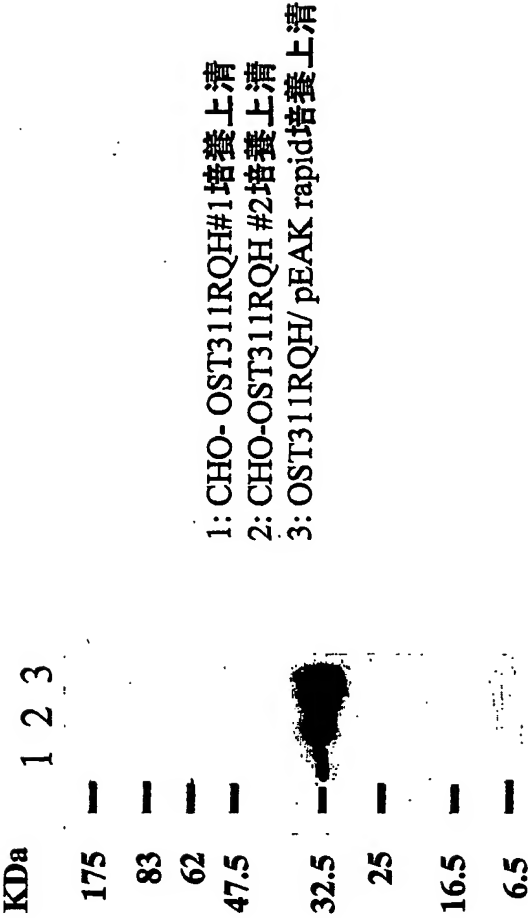


図18

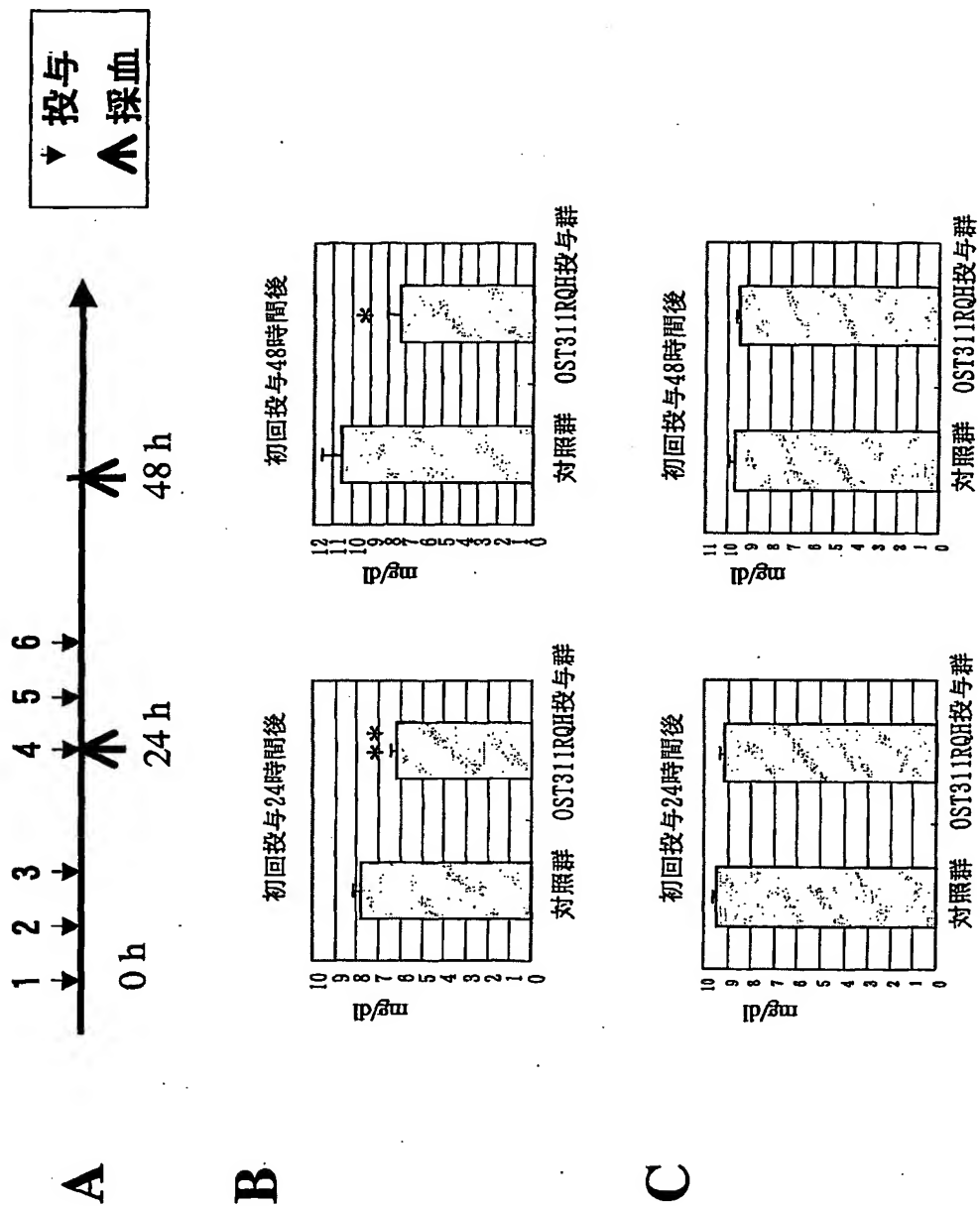


図19

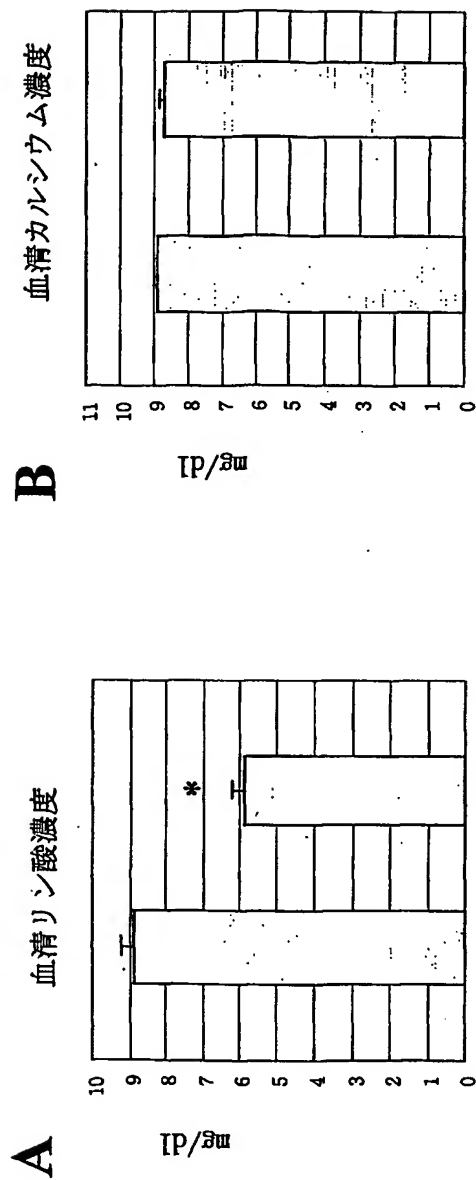


図20

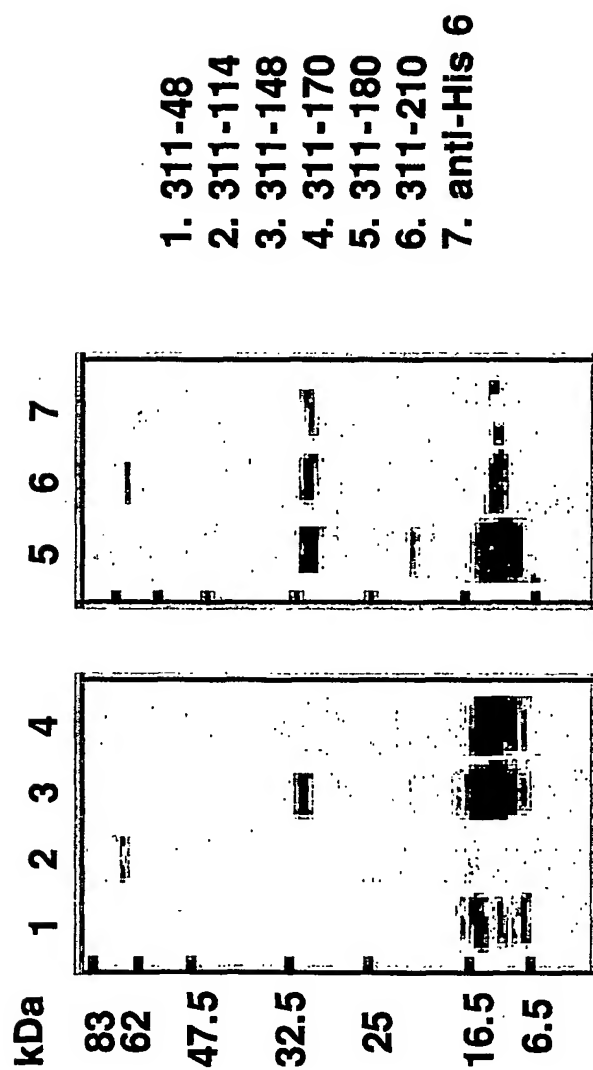


図21

検出用ビオチン化抗体

A

固相化抗体

	311-48	311-114	311-148	311-170	311-180	311-
311-48	0.014	0.022	0.027	0.019	0.019	210.016
311-114	0.024	0.018	0.020	0.016	0.018	0.018
311-148	0.131	0.127	0.102	0.119	0.106	0.098
311-170	0.030	0.027	0.041	0.027	0.029	0.027
311-180	0.082	0.081	0.110	0.080	0.103	0.069
311-210	0.064	0.060	0.071	0.052	0.059	0.052

A450 nm/A570 nm

B

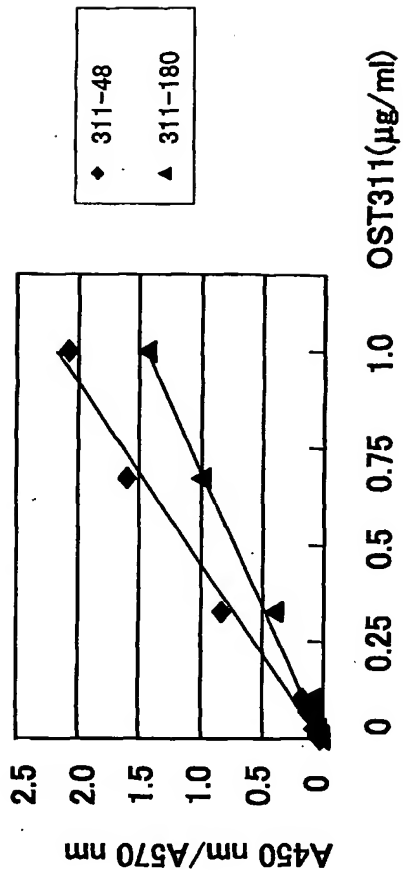
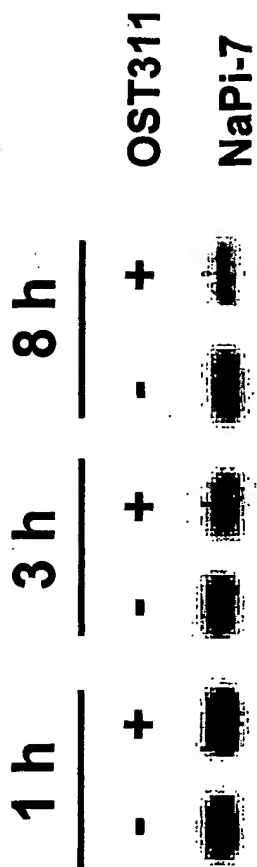


図22

A



B

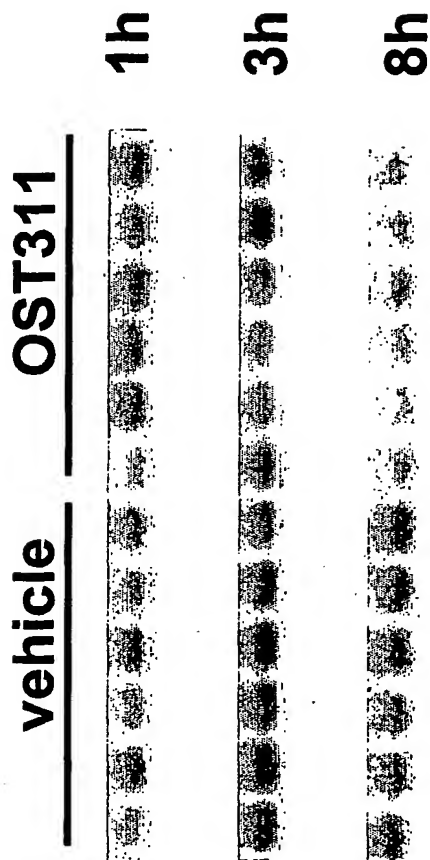


図23

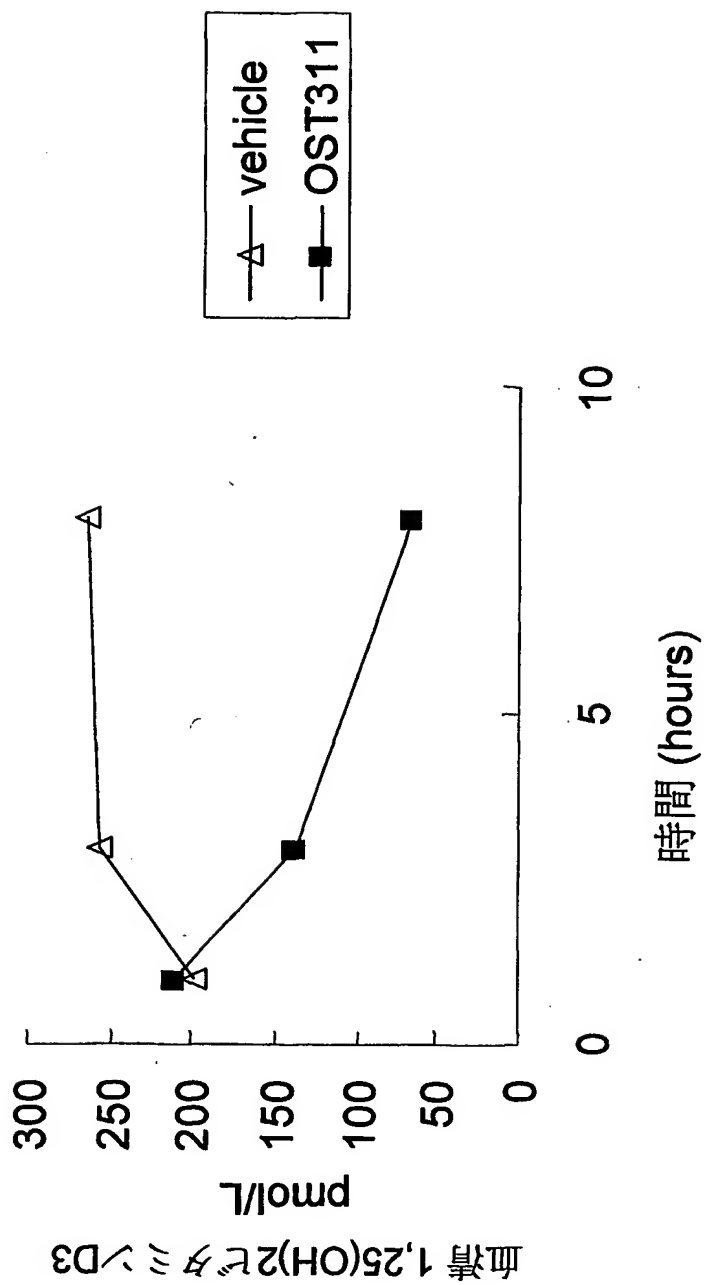


図24

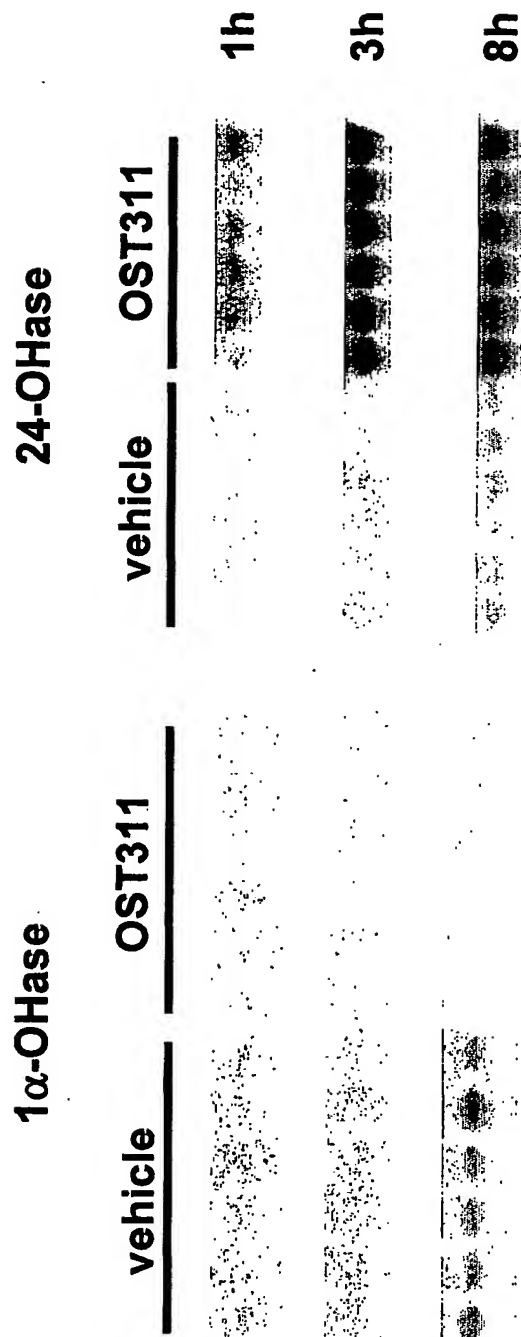
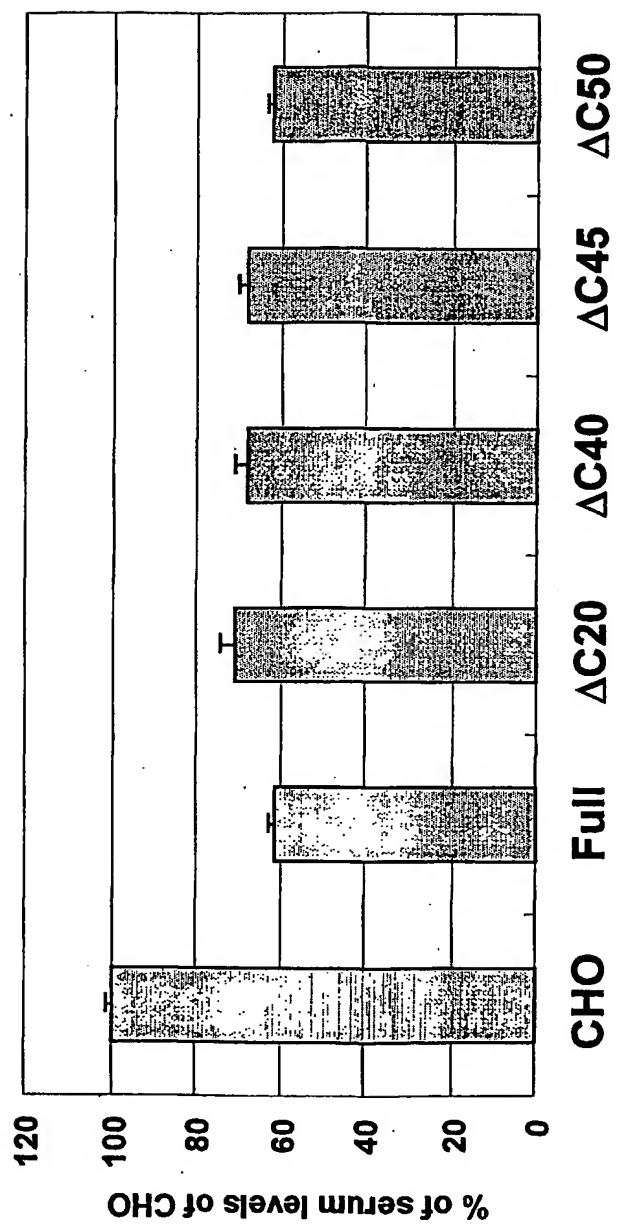


図25

血清リノ酸濃度



26

His-OST311

MK-OST311

ATGGGACAGCGCATCATCATGATCAGCAGCGCGCTGGTGGCGGCGGCGACGCCAT
 M G S S H H H H H S S S G L V P R G S H
 atgtATCCCAATGCCCTCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCTGATCCACCTGTAC
 M Y P N A S P L L G S S W G G L I H L Y
 ACAGCCACAGCCAGGAACAGGTACACGCTGCAGATCCACAAGAAATGGCCATGTGGATGGC
 T A T A R N S Y H L Q I H K N G H V D G
 GGACCCCATCAGACCATGTACAGTGGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTG
 A P H Q T I Y S A L M I R S E D A G F V
 GTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTGCTGCATGGATTTTCAGAGGCAACATTTT
 V I T G V M S R R Y L C M D F R G N I F
 GGATCAGACTATTTCCAGCCCGGAGAACTGCAGGTTCCAAACACAGACAGGTGGAAGACGG
 G S H Y F D P E N C R F Q H Q T L E N G
 TACGACGTCTACCACTGCTCCTCAGTATCAGTTCCCTGGTCACTGCTGGGCGGGGGAAGAGA
 Y D V Y H S P Q Y H F L V S L G R A K R
 GCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGGTACTCCAGTTCCCTGTCCTGGAGGAACGAG
 A F L P G M N P P P Y S Q F L S R R N E
 ATCCCCGCTAATTCACTTCAACACCCCATACACAGCGGCGCACACCCGAGCGCGAGGAC
 I P L I H F N T P I P R R H T T R S A E D
 GACTCGAGCGGGACCCCGTGAACGTGCTGAAGCCCGGGCCCGATGACCCCGGGCCCG
 D S E R D P L N V L K P R A R M T P A P
 GCCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAGCGCGAGGAACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCA
 A S C S Q E L P S A E D N S P M A S D P
 TTAGGGGTGTTGAGGGCGGTGAGTGAACACGACGCTGGGGGAACCGGGCCCGAAGGC
 L G V V R G G R V N T H A G G T G P E G
 TGGCGCCCGCTTGGCCAAAGTTTCATCTAG
 C R P F A K F I *

atgaaaTACCAGAACGGCTTCCCGGCTGGTGGgtceagctggggTGGCCCTGATCCACCGTG
 M K Y P N A S P L L G S S W G G L I H L
 TACACAGCCACAGCCAGGAACAGCTACACCTGCAGATCCACAAGAAATGGCCATGTGGAT
 Y T A T A R N S Y H L Q I H K N G H V D
 GGCGACCCCATCAGACCATGTACAGTGGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTT
 G A P H Q T I Y S A L M I R S E D A G F
 GTGGTATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACTGCTGCATGGATTTTCAGAGGCAACATT
 V V I T G V M S R R Y L C M D F R G N I
 TTTGGATCAGACTATTTCCAGCCCGGAGAACTGCAGGTTCCAAACACAGAGCGCTGGAAGAC
 F G S H Y F D P E N C R F Q H Q T L E N
 GGGTACAGGCTTACCACTGCTCCTCAGTATCAGTTCCCTGGTCACTGCTGGCGCGGGCGAAG
 G Y D V Y H S P Q Y H F L V S L G R A K
 AGAGCCTTCCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGGTACTCCAGTTCCCTGTCCTGGAGGAAC
 R A F L P G M N P P P Y S Q F L S R R N
 GAGTCCCGCTAATTCACTTCAACACCCCATACACAGCGGCGCACACCCGAGCGCGGAG
 E I P L I H F N T P I P R R H T T R S A E
 GACGACTCGGAGCGGGACCCCGTGAACGTGCTGAAGCCCGGGCCCGGATGACCCCGGGCC
 D D S E R D P L N V L K P R A R M T P A
 CCGGCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAGCGCGGAGGAACAACAGCCCGATGGCCAGTGAC
 P A S C S Q E L P S A E D N S P M A S D
 CCATTAGGGGTGTTGAGGGCGGTGAGTGAACACAGCAGCAGCTGGGGGAACCGGGCCCGGAA
 P L G V V R G G R V N T H A G G T G P E
 GGCTGCCCGCCCTTCCCAAGTTTCATCTAG
 G C R P F A K F I *

27

His-OST311

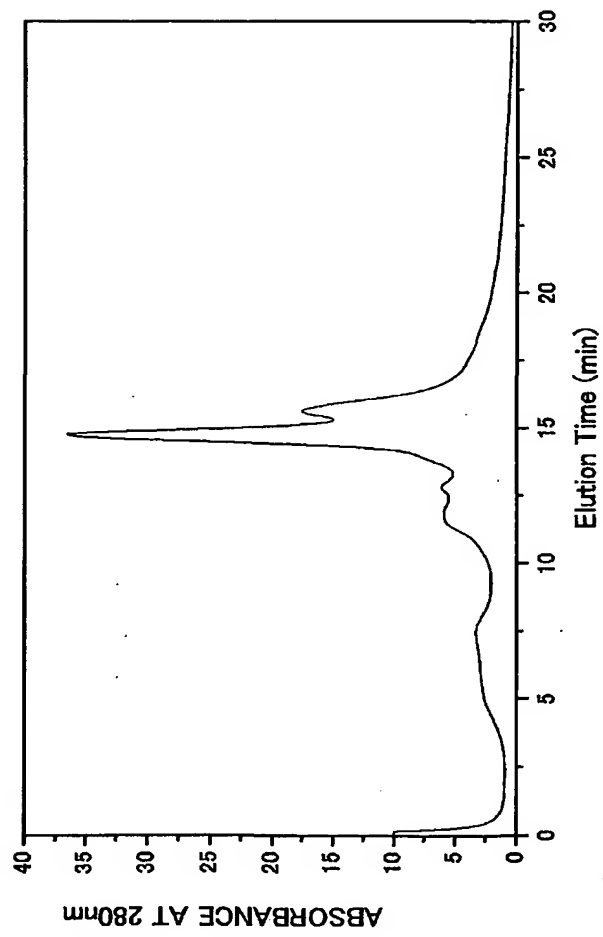


図28

MK-OST311

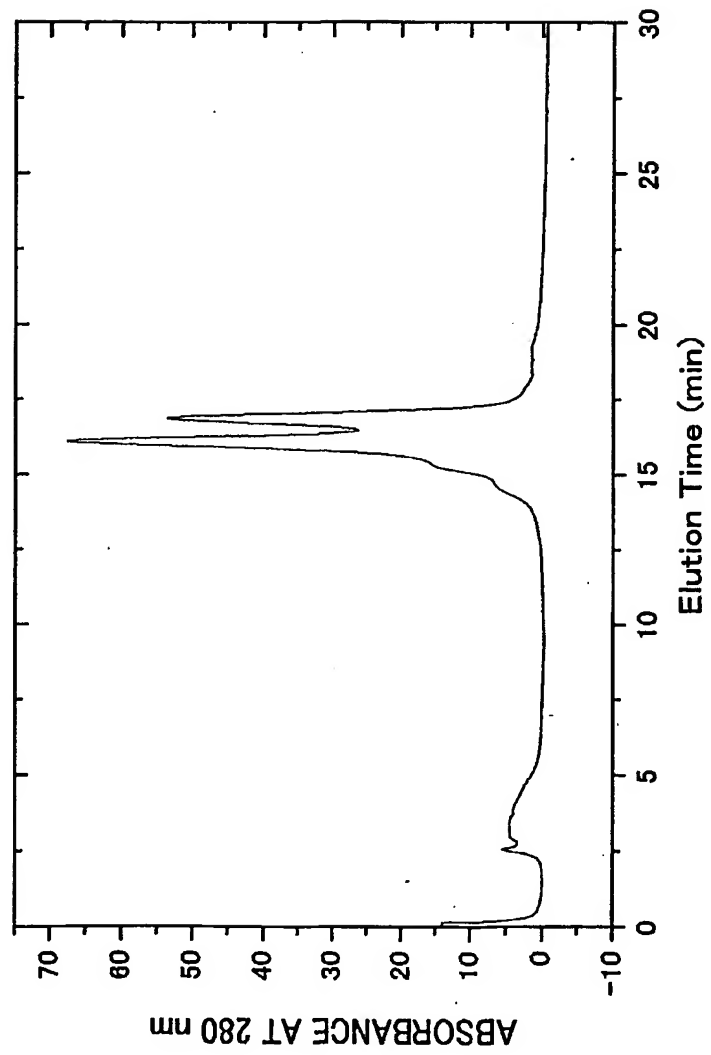


図29

PEG4LMK-OST311

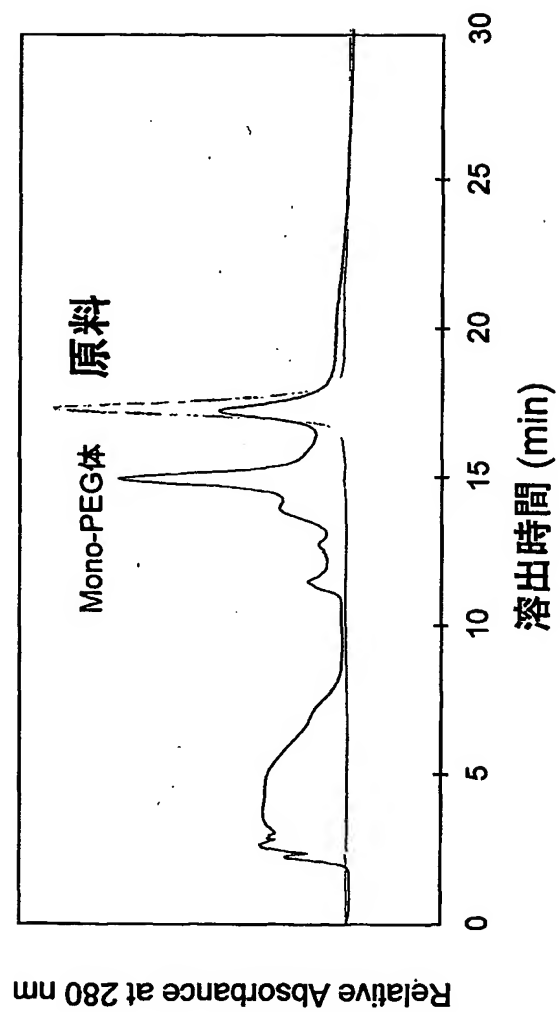


図30

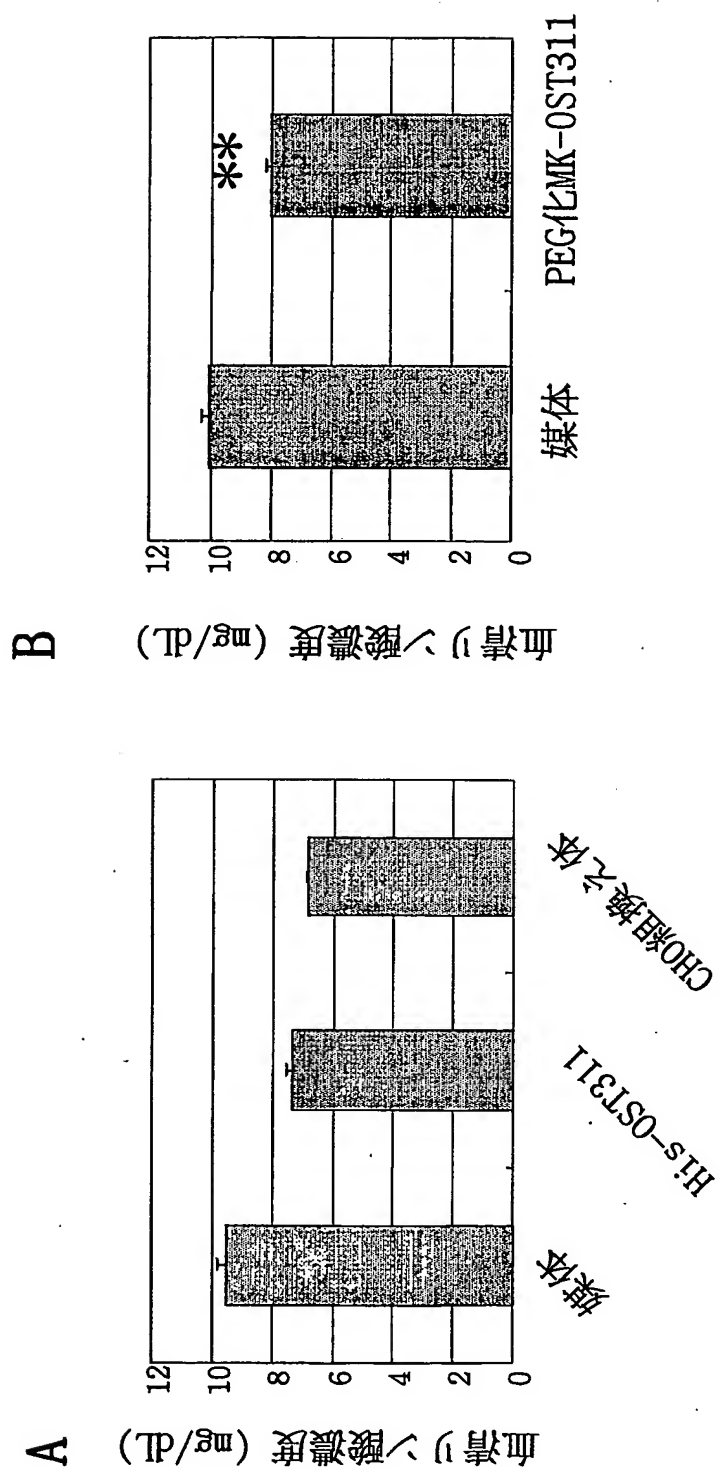


图31

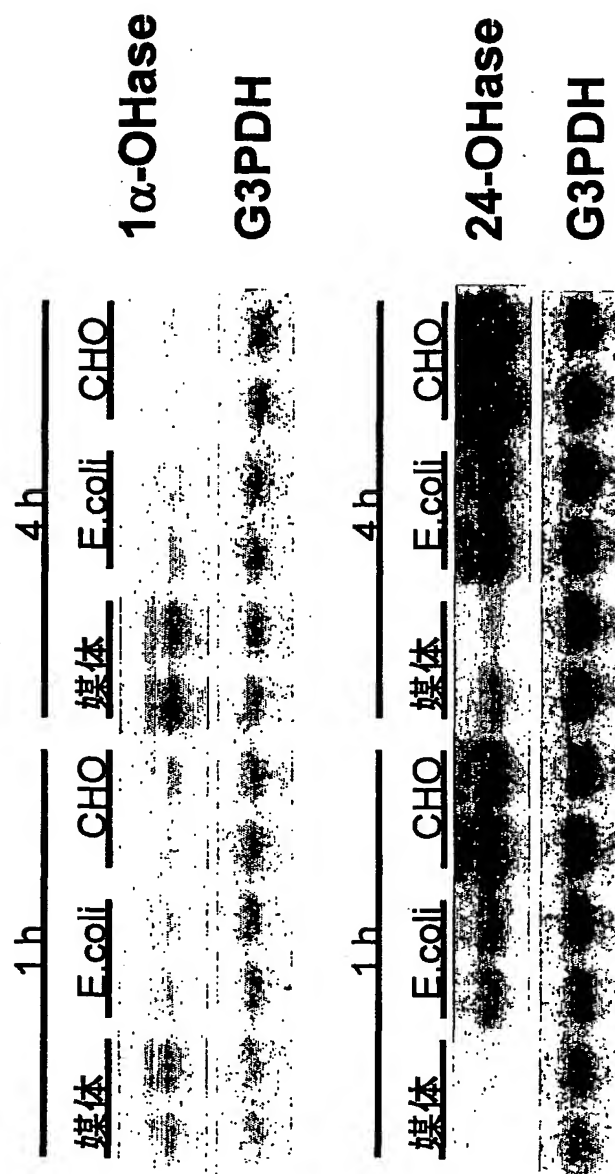
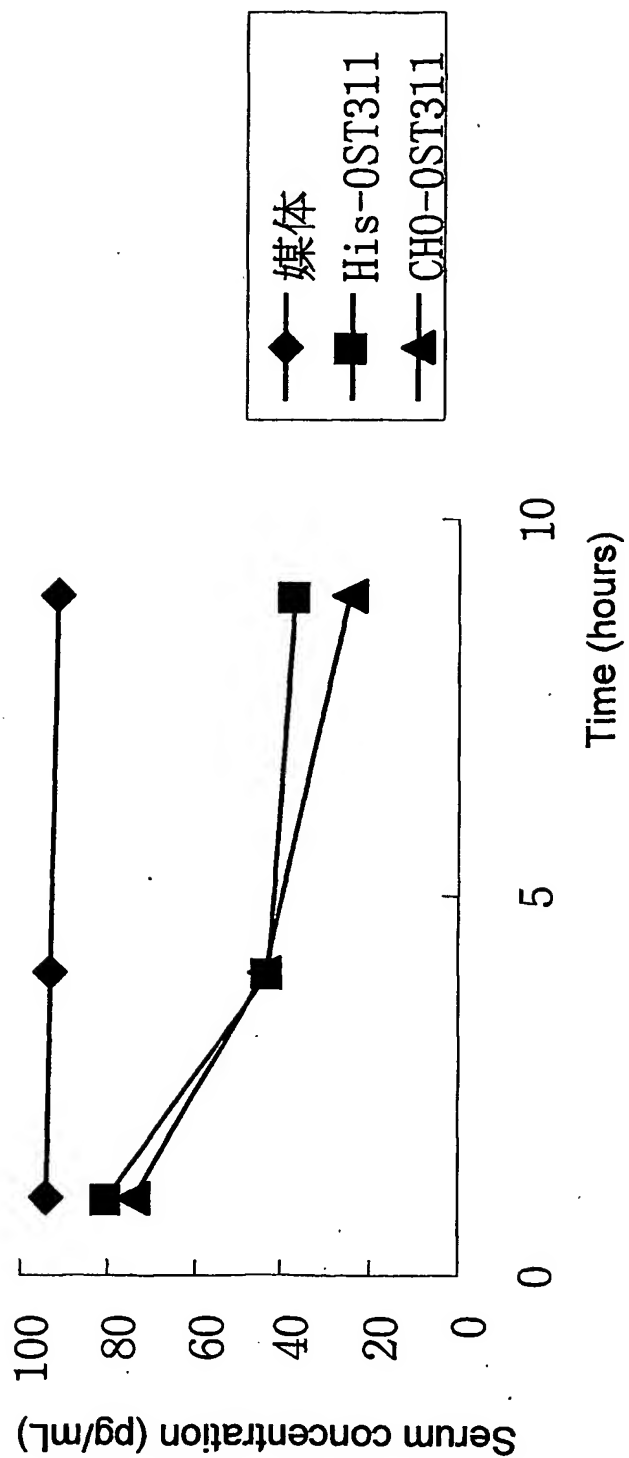


図32



B

A

MW(kDa)

175

38

62

47.5

32.5

25

16.5

6.5

Marker

Wild type

R176Q,R179Q

R175Q

R176Q

R1790

R179W

Vehicle

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> DNA encoding a polypeptide regulating phosphate metabolism,
calcium metabolism and calcification.

<130> PH-1268PCT

<140>

<141>

<150> JP2000-245144

<151> 2000-08-11

<150> JP2000-287864

<151> 2000-09-21

<150> JP2000-391027

<151> 2000-12-22

<150> JP2001-121527

<151> 2001-04-19

<160> 87

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2770

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (133).. (885)

<400> 1

gaatccagtc taggatcctc acaccagcta ctigcaaggg agaaggaaaa ggccagtaag 60

gcctgggcca ggagagtcctc gacaggagtg tcaggtttca atctcagcac cagccactca 120

gagcagggca cg atg ttg ggg gcc cgc ctc agg ctc tgg gtc tgt gcc ttg 171

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu

1

5

10

tgc agc gtc tgc agc atg agc gtc ctc aga gcc tat ccc aat gcc tcc 219

Cys Ser Val Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser

15

20

25

cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc cac ctg tac aca gcc 267

Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala

30

35

40

45

aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac aag aat ggc cat gtg 315

Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val

	50	55	60	
gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc ctg atg atc aga tca				363
Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser				
	65	70	75	
gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg atg agc aga aga tac				411
Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr				
	80	85	90	
ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga tca cac tat ttc gac				459
Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp				
	95	100	105	
ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg gaa aac ggg tac gac				507
Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp				
	110	115	120	125
gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc agt ctg ggc cgg gcg				555
Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala				
	130	135	140	
aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc ccg tac tcc cag ttc				603
Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe				
	145	150	155	
ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac ttc aac acc ccc ata				651
Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile				
	160	165	170	

cca cgg cgg cac acc cgg agc gcc gag gac gac tcg gag cgg gac ccc 699
 Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro

175

180

185

ctg aac gtg ctg aag ccc cgg gcc cgg atg acc ccg gcc ccg gcc tcc 747
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser

190

195

200

205

tgt tca cag gag ctc ccg agc gcc gag gac aac agc ccg atg gcc agt 795
 Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser

210

215

220

gac cca tta ggg gtg gtc agg ggc ggt cga gtg aac acg cac gct ggg 843
 Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly

225

230

235

gga acg ggc ccg gaa ggc tgc cgc ccc ttc gcc aag ttc atc 885
 Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

240

245

250

taggtcgct ggaaggccac cctctttaac ccacccctca gcaaagcag ctcttcccaa 945

ggaccaggtc ccttgacgtt ccgaggatgg gaaaggtagc aggggcatgt atggaatttg 1005

ctgcttctct ggggtccctt ccacaggagg tcctgtgaga accaaccttt gaggcccaag 1065

tcatgggggtt tcaccgcctt cctcactcca tatagaacac ctcttcccaat aggaaacccc 1125

aacaggtaaa ctagaaattt ccccttcatg aaggtagaga gaaggggtct ctcccaacat 1185
atttctcttc cttgtgcctc tcctctttat cacttttaag cataaaaaaa aaaaaaaaaa 1245
aaaaaaaaaa aaaaagcagt gggttcctga gctcaagact ttgaagggtg agggaagagg 1305
aaatcggaga tcccagaagc ttctccactg ccctatgcat ttatgttaga tgccccgata 1365
ccactggcat ttgagtgtgc aaaccttgac attaacagct gaatggggca agttgatgaa 1425
aacactactt tcaagccttc gtctctcctt gagcatctct ggggaagagc tgtcaaaaga 1485
ctggtagtag gctggtgaaa acttgacagc tagacttgat gcttgctgaa atgaggcagg 1545
aatcataata gaaaactcag cctccctaca gggtagcac ctctgtctc gctgtctccc 1605
tctgtgcagc cacagccaga gggcccagaa tggccccact ctgttcccaa gcagttcatg 1665
atacagcctc accttttggc cccatctctg gttttgaaa atttggctta aggaataaat 1725
agcttttaca ctggctcacg aaaatctgcc ctgctagaat ttgcttttca aaatggaaat 1785
aaattccaac tctcctaaga ggcatttaat taaggctcta ctccagggtt gagtaggaat 1845
ccattctgaa caaactacaa aaatgtgact gggaaggggg ctttgagaga ctgggactgc 1905
tctgggttag gttttctgtg gactgaaaaa tcgtgtcctt ttctctaaat gaagtggcat 1965
caaggactca gggggaaaga aatcagggga catgttatag aagttatgaa aagacaacca 2025

catggcagg ctcttgctg tggctctag ggctctgcag cagcagtggc tcttcgatt 2085
gttaaaactc tcctaggctg acacatctgg gtctcaatcc ccttggaat tcttggtgca 2145
ttaaatgaag ccttacccca ttactgcggt tcttcctgta agggggctcc atttctctcc 2205
ctctctttaa atgaccacct aaaggacagt atattaacaa gcaaagtcga ttcaacaaca 2265
gcttcttccc agtcacitct tttttctca ctgccatcac atactaacct tatactttga 2325
tctattcttt ttggttatga gagaaatgtt gggcaactgt ttttacctga tggttttaag 2385
cigaacttga aggactggtt cctattctga aacagtaaaa ctatgtataa tagtatatag 2445
ccatgcatgg caaatatctt aatatttctg ttttcattc ctgttggaat tattatctg 2505
cataatagct attggaggct cctcagtga agatcccaaa aggattttgg tggaaaacta 2565
gttgtaatct cacaaactca acactaccat caggggtttt ctttatggca aagccaaaat 2625
agctcctaca atttcttata tccctcgta tgtggcagta tttatttatt tatttggaag 2685
ttgcctatc ctctatatt tatagatatt tataaaaatg taaccctttt ttcctttctt 2745
ctgtttaaaa taaaaataaa attta 2770

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val

1

5

10

15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg

35

40

45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala

50

55

60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala

65

70

75

80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met

85

90

95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn

100

105

110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His

115

120

125

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala

130 135 140
Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
145 150 155 160
Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg
165 170 175
His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
180 185 190
Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
195 200 205
Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
210 215 220
Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
225 230 235 240
Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
245 250

<210> 3

<211> 684

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (684)

<400> 3

tat ccc aat gcc tcc cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc 48

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

cac ctg tac aca gcc aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac 96

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His

20

25

30

aag aat ggc cat gtg gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc 144

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala

35

40

45

ctg atg atc aga tca gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg 192

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val

50

55

60

atg agc aga aga tac ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga 240

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly

65

70

75

80

tca cac tat ttc gac ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg 288

Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu

85

90

95

gaa aac ggg tac gac gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc 336

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val	
100 105 110	
agt ctg ggc cgg gcg aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc	384
Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro	
115 120 125	
ccg tac tcc cag ttc ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac	432
Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His	
130 135 140	
ttc aac acc ccc ata cca cgg cgg cac acc cgg agc gcc gag gac gac	480
Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp	
145 150 155 160	
tcg gag cgg gac ccc ctg aac gtg ctg aag ccc cgg gcc cgg atg acc	528
Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr	
165 170 175	
ccg gcc ccg gcc tcc tgt tca cag gag ctc ccg agc gcc gag gac aac	576
Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn	
180 185 190	
agc ccg atg gcc agt gac cca tta ggg gtg gtc agg ggc ggt cga gtg	624
Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val	
195 200 205	
aac acg cac gct ggg gga acg ggc ccg gaa ggc tgc cgc ccc ttc gcc	672
Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala	

210

215

220

aag ttc atc tag

684

Lys Phe Ile

225

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His

20

25

30

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala

35

40

45

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val

50

55

60

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly

65

70

75

80

Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu

85

90

95

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val
100 105 110

Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro
115 120 125

Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His
130 135 140

Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp
145 150 155 160

Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr
165 170 175

Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn
180 185 190

Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val
195 200 205

Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala
210 215 220

Lys Phe Ile
225

<210> 5

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (465)

<400> 5

tat ccc aat gcc tcc cca ctg ctc ggc tcc agc tgg ggt ggc ctg atc 48

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

cac ctg tac aca gcc aca gcc agg aac agc tac cac ctg cag atc cac 96

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His

20

25

30

aag aat ggc cat gtg gat ggc gca ccc cat cag acc atc tac agt gcc 144

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala

35

40

45

ctg atg atc aga tca gag gat gct ggc ttt gtg gtg att aca ggt gtg 192

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val

50

55

60

atg agc aga aga tac ctc tgc atg gat ttc aga ggc aac att ttt gga 240

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly

65

70

75

80

tca cac tat ttc gac ccg gag aac tgc agg ttc caa cac cag acg ctg 288
 Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu

85

90

95

gaa aac ggg tac gac gtc tac cac tct cct cag tat cac ttc ctg gtc 336
 Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val

100

105

110

agt ctg ggc cgg gcg aag aga gcc ttc ctg cca ggc atg aac cca ccc 384
 Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro

115

120

125

ccg tac tcc cag ttc ctg tcc cgg agg aac gag atc ccc cta att cac 432
 Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His

130

135

140

ttc aac acc ccc ata cca cgg cgg cac acc cgg 465
 Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg

145

150

155

<210> 6

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His
20 25 30

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala
35 40 45

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val
50 55 60

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly
65 70 75 80

Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu
85 90 95

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val
100 105 110

Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro
115 120 125

Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His
130 135 140

Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg
145 150 155

<210> 7

<211> 219

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (216)

<400> 7

agc gcc gag gac gac tcg gag cgg gac ccc ctg aac gtg ctg aag ccc 48

Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro

1

5

10

15

cgg gcc cgg atg acc ccg gcc ccg gcc tcc tgt tca cag gag ctc ccg 96

Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro

20

25

30

agc gcc gag gac aac agc ccg atg gcc agt gac cca tta ggg gtg gtc 144

Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val

35

40

45

agg ggc ggt cga gtg aac acg cac gct ggg gga acg ggc ccg gaa ggc 192

Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly

50

55

60

tgc cgc ccc ttc gcc aag ttc atc tag

219

Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

65

70

<210> 8

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro

1

5

10

15

Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro

20

25

30

Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val

35

40

45

Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly

50

55

60

Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

65

70

<210> 9

<211> 543

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (540)

<400> 9

gcc ctg atg att aca tca gag gac gcc ggc tct gtg gtg ata aca gga 48

Ala Leu Met Ile Thr Ser Glu Asp Ala Gly Ser Val Val Ile Thr Gly

1

5

10

15

gcc atg act cga agg ttc ctt tgt atg gat ctc cac ggc aac att ttt 96

Ala Met Thr Arg Arg Phe Leu Cys Met Asp Leu His Gly Asn Ile Phe

20

25

30

gga tgc ctt cac ttc agc cca gag aat tgc aag ttc cgc cag tgg acg 144

Gly Ser Leu His Phe Ser Pro Glu Asn Cys Lys Phe Arg Gln Trp Thr

35

40

45

ctg gag aat ggc tat gac gtc tac ttg tgc cag aag cat cac tac ctg 192

Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr Leu Ser Gln Lys His His Tyr Leu

50

55

60

gtg agc ctg ggc cgc gcc aag cgc atc ttc cag ccg ggc acc aac ccg 240

Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ile Phe Gln Pro Gly Thr Asn Pro

65

70

75

80

ccg ccc ttc tcc cag ttc ctg gct cgc agg aac gag gtc ccg ctg ctg 288

Pro Pro Phe Ser Gln Phe Leu Ala Arg Arg Asn Glu Val Pro Leu Leu

85

90

95

cat ttc tac act gtt cgc cca cgg cgc cac acg cgc agc gcc gag gac 336

His Phe Tyr Thr Val Arg Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp

100

105

110

cca ccg gag cgc gac cca ctg aac gtg ctc aag ccg cgg ccc cgc gcc 384
 Pro Pro Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Pro Arg Ala

115

120

125

acg cct gtg cct gta tcc tgc tct cgc gag ctg ccg agc gca gag gaa 432
 Thr Pro Val Pro Val Ser Cys Ser Arg Glu Leu Pro Ser Ala Glu Glu

130

135

140

ggc ggc ccc gca gcc agc gat cct ctg ggg gtg ctg cgc aga ggc cgt 480
 Gly Gly Pro Ala Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Leu Arg Arg Gly Arg

145

150

155

160

gga gat gct cgc ggg ggc gcg gga ggc gcg gat agg tgt cgc ccc ttt 528
 Gly Asp Ala Arg Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Arg Cys Arg Pro Phe

165

170

175

ccc agg ttc gtc tag

543

Pro Arg Phe Val

180

<210> 10

<211> 180

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Ala Leu Met Ile Thr Ser Glu Asp Ala Gly Ser Val Val Ile Thr Gly

1

5

10

15

Ala Met Thr Arg Arg Phe Leu Cys Met Asp Leu His Gly Asn Ile Phe
20 25 30

Gly Ser Leu His Phe Ser Pro Glu Asn Cys Lys Phe Arg Gln Trp Thr
35 40 45

Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr Leu Ser Gln Lys His His Tyr Leu
50 55 60

Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ile Phe Gln Pro Gly Thr Asn Pro
65 70 75 80

Pro Pro Phe Ser Gln Phe Leu Ala Arg Arg Asn Glu Val Pro Leu Leu
85 90 95

His Phe Tyr Thr Val Arg Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp
100 105 110

Pro Pro Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Pro Arg Ala
115 120 125

Thr Pro Val Pro Val Ser Cys Ser Arg Glu Leu Pro Ser Ala Glu Glu
130 135 140

Gly Gly Pro Ala Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Leu Arg Arg Gly Arg
145 150 155 160

Gly Asp Ala Arg Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Arg Cys Arg Pro Phe
165 170 175

Pro Arg Phe Val

180

<210> 11

<211> 13200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggctctcatg gccttagctc taacatgttg tatgggtttg gacaccttga aaagtgccta 60

ggaggctctg gggccagacc tggattcaaa tccaacctct tccacatgtt acctttctat 120

ctctaggcaa gttacttaaa ctgtgtgcat agatcagttt cctgatctat ataaagaaaa 180

taacagcatc tcctcaaaga gttattctga agatgaaatg ggttactaca agtaaagcac 240

ttagagcagt aagtggaaca gtaagctctc catgagcgtt agttcttgct gtgattcttt 300

ggagaagcag cctaggggaag gagaagacct tgtcctggct ctaccattta ttigtcttgt 360

gcctttggac atggaaacac taagatttcc atttcttcat gtaaagtatt aaaatcttga 420

taatgcatgg agtgcctatc tcacagagtg gcagtgaggi tcaaataagc taatagaatg 480

gaaaatgctt tgtaaaactat aaaaaaaaaac tgtacaaatg tagggtaaca aatgccatct 540

ctttctgtct atacctgtaa gcttgcactc attttgtatt atagttactt atttttatct 600

gcctcctgca ttagatttga gctcctcaag ataggaatca catcttgctg tctcctatat 660
caaccigtac atgagtctag ctgatgcct gtacatggca tatactcagt acagggaaac 720
tggaagaata gcaaactcct tgtgtgtttt ttgggtgtg tgttccagta gcttgctccc 780
ctttagactg tatgtgccag gactattcca cccgacatca ggtgtagctt cccagagggc 840
tcactigtga cagcatctgc aggcaggcat ccaacaccaa gctgagcact catgtacaga 900
cactaaatgt ggggacaccc tgtcctgagg ctgggatecc cagtgtcag ccagcagctg 960
ttccaatccc catgaggtct ctgaatgagt ctcttacta ctggagagac tactagtitta 1020
gttgccctcg atagtccaaa ctagggaat tgagaaattg aaccttggca tattcagtga 1080
agtcagact aaggaagctg agaaactgaa ccttggcatg ttacttgacc tcaaggcctt 1140
acttcttttt ctccatttc aaaatcttcc caaatggca actttggctt ttgtgccct 1200
gctcctagct cccatcttcc atgaagtggg tgttcttaga ggatgccatc tgcctgatgg 1260
tgtcatgtat ctctatatcc tgcaagctac ccaccaaacc ctgtcacag attaagcact 1320
ggatacatac ttgctgattg gaatttaaag aaaacaaaa taagtaaact cgacaggaga 1380
ttaattgcct aggagtcggt tgactgcttg actgaagctg gatttttttt gggaaccgct 1440

ggctgccttc acatttcctg atggaagtgg gacaggtcaa cagacagccc agagtggcag 1500
ataacttttg cccacacgtc attcattttt tggagcgttg gcttgaaatt gaggggtgtg 1560
tgtgtctgga accgacgtgc ctccgtgcg cctccggggt cttgcactt tctttcaatg 1620
ggctgattac aacacagagg atgtggacag tggagttttt cctgtttgat gtcacactgc 1680
taccctttta aagtctgacg gcaaaaagga gggaatccag tctaggatcc tcacaccagc 1740
tacttgcaag ggagaaggaa aaggccagta aggcctgggc caggagagtc cgcacaggag 1800
gtcaggittt caatctcagc accagccact cagagcaggg cacgatgttg ggggcccgcc 1860
tcaggctctg ggtctgtgcc ttgtgcagcg tcigcagcat gagcgtcctc agagcctatc 1920
ccaatgcctc cccactgctc ggctccagct ggggtggcct gatccacctg tacacagcca 1980
cagccaggaa cagctaccac ctgcagatcc acaagaatgg ccatgtggat ggcgaccccc 2040
atcagaccat ctacagttag tagggcttca ggctgggaag aaggggagca cccttgttgt 2100
ccatctacag gaggtttggg gaggttgggg actagactgg agggctaate caaccctcct 2160
agctttctgc ccaggaacca ctatttgtct ttgtgtgtgt gtgtgtttgt gtgtgtgtgt 2220
gtgtgcgtgt gtatttaaaa cttaggggaa gattctgtca ctctcctaai tagcatttgc 2280
tggtttttct caatatgaat aatttttatt tcaactaaaa cccttcccac agtaggagcc 2340

atgttccctt tgccccgtca aaagattgaa aaaatgtaca gaaagaaagg caaggagtct 2400
aagagaaaaa gaagccaggc agatcaacag acactaagtt tcagctcatg gactttggac 2460
tgggttaact agggagggtg taaagattcc tgggicatac ccagattggt atagataaat 2520
ctgggggctc tttccaactc tggccttata aaaattcttg gaaaaatgia ttaaagacag 2580
actgtccatg tatgttgtct tggtgagaat ggccaagtat acaacccatc cacccattca 2640
tttgtccaig catccatcca tccatccatc catccatcca tccatccatc catccatcca 2700
tccaacaggt ttaatgggtg tttcagacac ccaggtaccc aggtacccag tatgagttgg 2760
tgattcttct ctgtggaact gaaagggtgc cagtcagtag caagtcaagc tagttagaaa 2820
cttatiggca acatgagaca actggaatgt ttttaaagat caggtttgtg gagaattigga 2880
tcacaatcca caataatcaa tccattagca atgattcaaa tgagggtccc ttigtgtgca 2940
cctatataag gggtaatgtg gtgaaagcag ggatagatat tgaaaaagac tggatcttct 3000
attttaagaa aacgtgagaa aacacctcaa agcatacaga aaaatgcaaa ctgatccaat 3060
atagctcaaa ttaaaggaaa gaaaaattag ttagacaatc tctaactaaa gaaaacatag 3120
gaattatgat ttgcccttta ttgttgtaat aaataaatta attatttttg ctgtgacctt 3180

gctgtgtgtg aggcatttat tcttctaggc tccaaaggct cttaaacctg gttgcaagat 3240
atacaacatg caaaattaag ttgcaagata tataacatgc gaaattgaca gtttaacctc 3300
ttcaagtact aaatgcata tgcaggaga taaaaggaga gaggaagtt ctctccgaat 3360
accaaacagg ttccagaact ccagagaata tagtaagact caggagtc aa catcttgga 3420
accaagtttg agtctcatgg caaaaatttc aattaaatct ggatacactt gatgcacccg 3480
aagtgtgtt cattttattc aatggatatt taataggatc taccatgtgc ctggcattct 3540
accaagcgct gtggctgaaa actaagacac aacccttcaa ggacctcatg gtctgtcgtc 3600
ctacctgtc agccagctca ctaccagact ttccaggaaat gcaattttgc atgtctcatg 3660
gaggggacac cttactcta attcaagact atatgtgggc cagggtgtgt ggctcacgcc 3720
tgtaatccca gcactctggg aggccgaggc aggcagatca cgaggtcagg agattgagac 3780
catcctggct aacacagtga aaccccatct ctactaaaaa taaaaaaaat tagccaggcg 3840
tggtggcagg cgctgtagt cccagctact tgggaggctg aggcaggaga atggcgtgaa 3900
cccgggaggc agagcttgca gtgagccgag attgcgccac tgcactccag cctgggtgac 3960
agagcgagac tccatctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagactat atgtgattta 4020
aaatgcagaa tagtagatta tggtaaatta ttttgattct cttagatgga aagggtgca 4080

tccaactaga gaatgittat acaacttgc tcgaatcctg gaatcccgtt gctgaaagga 4140
actccttaaa gacgtttctt cctgaacaag aattagggtg gaacagaaca ggccggctac 4200
ggtagggagt gagtgtgaag agtcaacctc ctgggctggc agtctgaact tagacctttt 4260
ccttgaaagc ccacctgta tcaggcccca agggatcact gagtgctagt tagagtgaat 4320
taaaatgact gagaagcagc aaaataaatt gaactgactt cagatittta aaaatagaaa 4380
tgtgattttg tttccttaga cataggcact agctaaacat tgcacttita aagagttaaa 4440
catgaatgcg gggaggggaa cttcgggtca gggtagtggg agggagatct acttttccta 4500
gtctatgtag ataacttttt gtactgttca atgagttgc atgtgtattt tgggaaaaaa 4560
aaagtcagg aaaaaattac acactacaat taaaagttac ccaaaagagg ccagatgcgg 4620
tggctcacgc gtataatctc agcactttgg gaggccgagg tgggaggatc acttgaagtc 4680
aggggttcga gaccagtcg gccaacatgg gaaaccctg tctctactaa aaatacaaaa 4740
attagtgggg tgttgtccct gcctgtagtc acagctactt gggaggctga ggcagaagaa 4800
tcgcttgtac cccagaggtg gagcttgagc tgagctgaga tcgcaccact gtgctccagc 4860
ctgggtgaca gagtgagact ccgtctcaaa aaaaaaacgt tacccaaaag aaagaggaaa 4920

gattaatgca thtagataag aagcacaact aattaaatgt ctggtgaagg atttgtaatg 4980

acctcatcag tgactgttaa gcaatgtttt tacactgatg gaaacctaaa atgtgagggg 5040

tattttttcc cctcctaatt atccatttct attgaattct ggtttatctt attactttgc 5100

tgtaagaaat tcttaagagt tgagtcaca acctatcttt gggtcactgg acttgacaaa 5160

atgaagttat ctctgccta ccagattctt caagctccct taggactcac aagcgctgct 5220

gccaggtacc cctctgggtg ccttatcacc cgttccatga acaaggccat cctctgactc 5280

cccittatcc ttattatatg gaaacagcaa gagagagatg ctattgtcc ctggtaatat 5340

catttcttag atcctgctat ttctacttcc tccatcttcc ccataggaac tatctttatt 5400

gaagctgaat taccgtgag ctcttcagc cttttcata cgtttttctt ttgaggtgct 5460

caaagcatt cactgctatc atcttattta tcacttactg gccacaagag tagaatggag 5520

tagataattt tctacttcta taagcagagg ttgaagcaaa gtggtaatag taaaaattac 5580

tagcacttag gaagtgttt ctaaaggata aaaacattat ctcatatgt cttcaagatg 5640

accaaagtag gtaaagtgtt ctgctgtcct cattttatat gtgaaaaaac aagagttaa 5700

gaacttaaat aactggctga aggtcagaca ggtagtaaaa gacctagagg acacctgac 5760

cccaaatccc aagctgttcc aaggtcacac gcacggagac acctccgtca ttgaaggcaa 5820

agtcattaa gcctgctcag ctccaacagg cggggctggt tgcctcggca gtccatgggt 5880
tgttccttcc ttctgcaaaa ttctcccttg aatctgtgca gactgcgaaa agatgccttt 5940
tgaaagcaca aaggaaagaa acctgactc tctcacattt tctaaacttt cacattggct 6000
cacactgttt gatggaagag tctgtgtgcc ctccgtagca gcttctcaca gtctctcaac 6060
caccgccgga tgttttctag ggggactggc tctggaaacc aggagcgtgt gtgccataca 6120
cactgcccac actgaccca agcatcaagc cagcacacct gtcaaggcat gggcccggca 6180
taaacagcag gtcagaacac gccacgtgat gtctctgtt tgcctgacac ttctgagtca 6240
cttttaccac cattatcccc ttgatcacc accctatgaa gtaggcagga cagccattgt 6300
tctatttcac agctgaggaa actgaggcta gtgcaaggtc agcaagtggc acaattggga 6360
ccaaaatcca agtcccttg ttcttggcac ctggctcagt gccccttccc cgagccctta 6420
gtgctgctgt gactccitgt cctcactgcc tgcagcatgt attttagcat ttgatattgt 6480
cttctcagac tcttagtgat ttctgttgga ggcttggttac cgggtggtgg gaagatgtct 6540
ctgacctgag ttcaatcct gtcttagttt ccttatcact taaattagga tattgctgct 6600
actactacta ctaataataa taataatcag tactaacaat ataaaatttg ttttgagaat 6660

ttaaaaatag taaagtgcct agagtgcac cgctcaaaga ccattactaa atgiaatttt 6720

ttcccaatta gactgaaaag tcaccagaac agaaaccatt tctttttttt ttttttgag 6780

acggagtctc gctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg cttactgcta 6840

gctccgcctc ccaggttcat gccattctcc tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac 6900

agggtcccac caacacacct ggctaatttt ttttgtattt tagtagagaa gaggtttcac 6960

cgtgttagcc aggatggctt tgaatctcgt acctcatgat ccacccgcct cagcctccca 7020

gagtgcctggg attacaggca tgagccaccg caccagtcg aaaccatttc ttacacgttc 7080

cttatatttc tccaaaggct taccacaaaa ctagccatac attgagaca cataggcaga 7140

caccactgtg gaggaattta agcatccttt gcgcctgtca taccacagtc cactttctgg 7200

gaagctttcc tcaaggttcc cctcagccaa actttgaaac aaattaactt ctctctttgg 7260

ccctcttctt ttctcacctt tctggggcct gtctccacc tcatccctc tgttccgcgt 7320

cagtcgaatt tcagtcctta tcatgatttc tactcagcta gtacctaat attgctgctt 7380

attttctca aaggtccttg tattgagcct gcatgggata ggagaagagc tttggccttt 7440

aaatcacccc cacaaggctc catcacttgc taggcacaaa cattgggcat ttacaacctc 7500

tccaagctac agttgcagaa gaggaattag aatccctgca tgggattcta gctgcctccc 7560

tggaggctat gaggtcagat gagatgcacc tagaaattct gtgataggca actggaagta 7620

gccccaaaga cctaaagtaa tgattittaa cagaaaatgt caggtaatta aataacatgt 7680

ggggaagaaa tctcgctgaa ttatcacgca tgitacacca gtatatgac taattgtgcc 7740

tttgccacaa aacagtaatt taaagccatt atcaattact taagaggtag gtcgtgtgaa 7800

tgggtttcag gcccttgcg gagactagtt ttigagagg gacactgaaa gtccatgagg 7860

ggctgcacct ggagaggta ccaccaagt agaaaatgac aaagaaccaa cccaagaaga 7920

gccaagaaga aaattccatc cgtcacitat attgattcaa cataaacagt tataccctct 7980

gctcctaagc agtcactct aaggaacgca ctggataggt aaactcagct aaagcaagtt 8040

aaatggaata catgctgtaa tagaggtgaa ggcattgtcc tgaggagctg agaaggaaga 8100

acaactgatt ttgaatggaa agatgaggaa agtcttcata gagatggtga cgcctgagcc 8160

tggctttgaa gagttagtga cttaataag tagagaagga agaggagat caactctact 8220

accattctgt acacatactg ggtgttgact gatgtattag acaattacac agacatccag 8280

gaggagaatc agactctatg gcaagctgga tccttgaaag acatctcagc atagatttaa 8340

aatcacaaa gtagaaggca tggaagaatg tgactatcac cacaaacatt caaaggtatt 8400

agtaaggcaa aagggaataa aaagacggtc caggtagaga gagagaaaca tgtgttcagc 8460

acaggtagaa gaattccagg agctcagagt gcccataca ggcaacaaga tgaagcagga 8520

ggtgaatgac tgtatgtgtg ttgggggcaa gagaggatgt cagaagaaac gctgaatatg 8580

cagaaatgag gctgaattta agagtgtga agttatcacc acccttaaaa tcaatccagg 8640

gaggtttcat gaaggtaggt ttccaggagg tgcttgaagg tgggaattgg atggcaatga 8700

gtctttgcc tgctgtttt tctccatagg tgccctgatg atcagatcag aggatgctgg 8760

ctttgtgtg attacaggtg tgatgagcag aagatacctc tgcattggatt tcagaggcaa 8820

catttttga tcagttagtt tctttttgt gtgtgtcacc atttgcaaac aattaacctt 8880

atttcttga cagacatag acttttctag cttacaatt ccatttcag tgtacctgg 8940

tgacctgttt ccatgatac ttcatgcagt ctaagtatga attaaacgtg aatgctcag 9000

tttaatagct ggggtttgaa ctccaggcaat ctggctccag atcccaggct ctcccccct 9060

agctgcact gccattgga acccactttt tttttttatt attatacttt aagttttagg 9120

gtacatgtgc acattgtga ggtagttac atacgtatac atgtgcatg ctggtgtgct 9180

gcaccacta actcatcatc tagcattagg tatatctccc aatgctatcc ctccccctc 9240

ccccacccc acaacagtcc ccagagtgtg atgttcccct tctgtgtcc atgtgatctc 9300

attgttcaat tcccacctac gagtgagaat atgcggtgtt tggttttttg ttcttgcgat 9360
agtttactga gaatgatggt ttccaatttc atccatgtcc ctacaaagga catgaactca 9420
tcatttttta tggctgcata gtattccatg gtgtatatgt gccacatttt cttaatccag 9480
tctatcattg ttggacattt gggttgtgga acccactttt gaatctagca caggccctgg 9540
tatgtagtgc taggtcctca agtcatgtca attcacgttg taaagtacat tagaaagggt 9600
gaaaagccat tgggtgtctt ttgattctgg gactagctgt gactttgggt aaatctcttc 9660
acttctccaa acttcagcat ttacattgg aaaaagcgaa gtggaataga ccacgtgacc 9720
tgiggagctc cctccagtta aagattttta attaataacc cctgccccaa ttgtgatagc 9780
tattcattcg gatttgtaag caaaggattt cccaaactaa aggctgctgg cctcttttgg 9840
aggattttga gatagtaaaa tagtaggact gcttatctca ggagctcttg accaccacac 9900
atgccacta gaaactccac aagaacagag actttctgtt ttgctttctg ctgcatccca 9960
gcccctacaa tagtgtctgg ctagagtagg taaacaaaca aacaaaaaat ctgttgaacc 10020
actattgaaa tatagataac taactaaaca tccgttaacc cctctaggca tgtagatagt 10080
cctgatctgt aaactgctta ctttgtggag cttaggattt aaaagaaata acaggcaaag 10140

gccttcgtgg ggcactcagt aaaacccagt actagtggta gaggattcaa acccagctca 10200
tcgttcagca aagttcatgt ctccaatccc gtcagtgcctc tcattcatgt ttgaccctat 10260
aaactccatc cctctctcctt tctccagtaa agagacaaac ccaagccaat tttcagccag 10320
cagaggcttg gaaaagatag agggcaggaa ggacaagggtg gtgcctactc caggaaaacc 10380
acaggccagg ccagcccggg cctccaggca gtaagcggag gcccagtag tcgtagtctc 10440
tgaaagggcg aactatatag tcagggttg agcattaatc aaaaccactc taccacagca 10500
gggaacaaag ggggaaggc tcaacgcctt aagaactgca gagcttcagg ccggctggca 10560
caagcatgtg gcccaggag gagctgggga gtgggtgggg ccccacatgc cagccttcac 10620
gtggttcgt cttgtccttc cagcactatt tcgaccgga gaactgcagg ttccaacacc 10680
agacgttga aaacgggtac gacgtctacc actctctca gtaacattc ctggtcagtc 10740
tgggccgggc gaagagagcc ttctgccag gcatgaacct acccccgtag tcccagttcc 10800
tgtcccgag gaacgagatc cccctaattc acttcaacac ccccatacca cggcggcaca 10860
cccggagcgc cgaggacgac tcggagcggg accccctgaa cgtgctgaag ccccgggccc 10920
ggatgacccc ggccccggcc tctgttcac aggagctccc gagcgccgag gacaacagcc 10980
cgatggccag tgaccattt ggggtgttca gggscggctc agtgaacacg cacgctgggg 11040

gaacgggccc ggaaggctgc cgcccccttcg ccaagttcat ctagggtcgc tggaaggcca 11100
ccctcttttaa cccatccctc agcaaacgca gctcttccca aggaccaggt cccttgacgt 11160
tccgaggatg ggaaaggta caggggcatg tatggaattt gctgcttctc tggggtccct 11220
tccacaggag gtctgtgag aaccaacctt tgaggcccaa gtcatgggtt ttcaccgcct 11280
tctcactcc atatagaaca cctttcccaa taggaaaccc caacaggtaa actagaaatt 11340
tccccctcat gaaggtagag agaaggggtc tctcccaaca tatttctctt ccttgtgcct 11400
ctctctttta tcacttttaa gcataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagcag 11460
tgggttcctg agtcaagac tttgaaggta tagggaagag gaaatcgag atcccagaag 11520
cttctccact gccctatgca tttatgttag atgccccgat cccactggca tttgagtgtg 11580
caaaccttga cattaacagc tgaatggggc aagttgatga aaacactact ttcaagcctt 11640
cgttcttctt tgagcatctc tggggaagag ctgtcaaaag actggtggta ggctggtgaa 11700
aacttgacag ctgacttga tgcttgctga aatgaggcag gaatcataat agaaaactca 11760
gcctccctac aggttgagca ccttctgtct cgctgtctcc ctctgtgcag ccacagccag 11820
agggccaga atggccccac tctgttccca agcagttcat gatacagcct caccttttgg 11880

ccccatctct ggTTTTgaa aatttggtct aaggaataaa tagcttttac actggctcac 11940

gaaaatctgc cctgctagaa ttTgcTtttc aaaatggaaa taaattccaa ctctcctaag 12000

aggcatttaa ttaaggctct acttccaggt tgagtaggaa tccattctga acaaactaca 12060

aaaatgtgac tgggaagggg gctttgagag actgggactg ctctgggtta ggTTTTctgt 12120

ggactgaaaa atcgtgtcct tttctctaaa tgaagtggca tcaaggactc agggggaaag 12180

aatcagggg acatgttata gaagttatga aaagacaacc acatggtcag gctcttgtct 12240

gtggctctta gggctctgca gcagcagtgg ctcttcgatt agttaaact ctcttaggct 12300

gacacatctg ggtctcaatc ccttggaaa ttcttggtgc attaaatgaa gccttaccct 12360

attactgagg ttcttctgt aagggggctc cattttctc cctctcttta aatgaccacc 12420

taaaggacag tatattaaca agcaaagtcg attcaacaac agcttcttcc cagtcacttt 12480

ttttttctc actgccatca catactaacc ttatacttg atctattctt ttTggTtatg 12540

agagaaatgt tgggcaactg tttttacctg atggttttaa gctgaacttg aaggactggf 12600

tcctattctg aaacagtaaa actatgtata atagtatata gccatgatg gcaaataatt 12660

taatatctct gttttcattt cctgttgga atattatcct gcataatagc tattggaggc 12720

tcctcagtga aagatcccaa aaggattttg gtggaaaact agttgtaatc tcacaaactc 12780

aacactacca tcaggggttt tctttatggc aaagccaaaa tagctcctac aatttcttat 12840
atccctcgtc atgtggcagt atttatatat ttatttggaa gtttgcctat ccttctatat 12900
ttatagatat ttataaaaat gtaacccctt tticctttct tctgittaaa ataaaaataa 12960
aatttatctc agcttctgtt agcttatcct cttttagta ctacttaaaa gcatgtcgga 13020
atataagaat aaaaaggatt atgggagggg aacattaggg aaatccagag aaggcaaaat 13080
tgaaaaaaag attttagaat tttaaaattt tcaaagattt cttccattca taaggagact 13140
caatgatattt aattgatcta gacagaatta tttaagtttt atcaatatig gatttctggt 13200

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

ttctgtctcg ctgtctccc

19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 13

ccccctccca gtcacattt

19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

ggggcatcta acataaatgc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 15

agccactcag agcagggcac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 16

ggtggcggcc gtctagaact a

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 17

tcagtctggg ccgggcgaag a

21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 18

cacgttcaag ggtcccgct

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 19

tctgaaatcc atgcagaggt

20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 20

gggaggcatt gggataggct c

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 21

ctagatgaac ttggcgaagg g

21

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

ccggaattca gccactcaga gcagggcacg

30

<210> 23

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatggt gatgatggat gaacttggcg aa 52

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24

taatacgact cactataggg 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

attaaccctc actaaaggga 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 26

accacagtc atgcatcac

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 27

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 28

Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly

1

5

10

15

Ala Pro His Gln Cys

20

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 29

Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser

1

5

10

15

Pro Gln Tyr His Cys

20

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 30

tgaaggtcgg tgtgaacgga ttggc

26

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 31

catgtaggcc atgaggicca ccac

24

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 32

gtaaagaacc ctgtgtattc c

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 33

ctgccttaag aaatccataa t

21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 34

gaggaatcac agtctcattc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 35

cttggggagg tgcccgggac

20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 36

tccctcttag aagacaatac a

21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 37

gtgtttaaag gcagtattac a

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 38

cagacagaga catccgtgta g

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 39

ccacatggtc caggttcagt c

21

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 40

gacggtagaga ctcggaacgt

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 41

tccgaaaaat ctggccatac

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 42

taatacgact cactataggg

20

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 43

gatttaggtg acactatag

19

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 44

ataagaatgc ggccgctcag atgaacttgg cgaa

34

<210> 45

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 45

atgaattcca ccatgttggg ggccccgcctc agg

33

<210> 46

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 46

atgcgccgc ctaatgatga tgatgatgat ggatgaactt ggcgaaggg

49

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 47

ataccacggc agcacaccca gagcgccgag

30

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 48

ataccacggc agcacaccca gagcgccgag

30

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 49

Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu

1

5

10

15

Cys

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 50

Cys Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg

1

5

10

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 51

Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Cys

1

5

10

15

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 52

Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Cys

1

5

10

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 53

atgaattcca ccatgttggg ggccccctc agg

33

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 54

atgcggccgc tatcgaccgc cctgaccac ccc

33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 55

atgcggccgc tacgggagct cctgtgaaca gga

33

<210> 56

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 56

atcgggccgc tcacggggtc atccggggccc gggg

34

<210> 57

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 57

aattccacca tgttgggggc ccgcctcagg ctctgggtct gtgcttgtgc agcgtctgca 60

gcatgagcgt cctgcatgc

79

<210> 58

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 58

aattgcatgc aggacgctca tgcigcagac gctgcacaag gcacagaccc agagcctgag 60

gcgggcccc aacatggtgg

80

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 59

atatgcatgc ctccagctgg ggtggcctga tccac

35

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 60

tgtatcccaa tgcctcccca ctg

23

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 61

atggatccct agatgaactt ggcgaaggg

29

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 62

atcatatgta tcccaatgcc tccccactg

29

<210> 63

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 63

atgcggccgc ctagatgaac tiggcgaagg g

31

<210> 64

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 64

gaattcatat gaaatacccg aacgcttccc cgctgctggg ctccagctg

49

<210> 65

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 65

cccaagcttg cggccgccta gatgaacttg gc

32

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 66

aacaccccca tagcacggcg gcaca

25

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 67

tgigccgccg tgctatgggg gtgtt

25

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 68

acccccatac cagcgcgga caccgc

26

<210> 69

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 69

cgggtgtgcc gcgctggtat gggggt

26

<210> 70

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 70

cccataccac gggcgcacac ccggag

26

<210> 71

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 71

ctccgggtgt gcgcccgtgg tatggg

26

<210> 72

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 72

ataccacggc gggccacccg gagcgc

26

<210> 73

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 73

gcgctccggg tggcccgcg tggtat

26

<210> 74

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 74

ccacggcggc acgcccggag cgccg

25

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 75

cggcgcctccg ggcgtagccgc cgtgg

25

<210> 76

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 76

cggcggcaca ccgcgagcgc cgagga

26

<210> 77

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 77

tcctcggcgc tcgcggtgtg ccgccg

26

<210> 78

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 78

cggcacaccc gggccgccga ggacga

26

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 79

tcgtcctcgg cggcccgggt gtgccg

26

<210> 80

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 80

acccccatac cacagcggca caccgc

26

<210> 81

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 81

cgggtgtgcc gctgtggtat ggggt

26

<210> 82

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 82

cccataccac ggcagcacac ccggag

26

<210> 83

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 83

ctccgggtgt gctgccgtgg tatggg

26

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 84

cggcggcaca cccagagcgc cgagga

26

<210> 85

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 85

tcctcggcgc tctgggtgtg ccgccg

26

<210> 86

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 86

cggcggcaca cctggagcgc cgagg

25

<210> 87

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 87

cctcggcgct ccagggtgtc cgccg

25

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**